

„DNA-Rekombination in Pflanzen durch funktionelle Rekombinaseaktivierung“

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Stephanie Biernacki
aus Recklinghausen

1. Referent: PD Dr. Klaus Düring
2. Referent: apl. Prof. Dr. Reinhard Hehl
eingereicht am: 10.04.2003
mündliche Prüfung (Disputation) am: 11.07.2003
Druckjahr: 2003

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| 1. Einleitung..... | 6 |
| 1.1 Markergen-Entfernung in Pflanzen..... | 7 |
| 1.2 Das FLP/ <i>FRT</i> -System aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 9 |
| 1.3 Regulation der FLP-Rekombinase..... | 10 |
| 1.4 Negativ-Selektionsmarker..... | 14 |
| 1.5 Ziel dieser Arbeit..... | 16 |
| 2. Material und Methoden..... | 17 |
| 2.1 Geräte und Ausstattung..... | 17 |
| 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 2.3 Biologisches Material..... | 19 |
| 2.3.1 Enzyme & Antikörper..... | 19 |
| 2.3.2 Oligonukleotide | 19 |
| 2.3.3 Plasmide | 20 |
| 2.3.4 Bakterienstämme..... | 24 |
| 2.3.5 Pflanzenmaterial | 24 |
| 2.4 Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> | 24 |
| 2.5 Molekularbiologische Standardmethoden..... | 25 |
| 2.5.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> | 25 |
| 2.5.2 Plasmid-Schnellisolierung aus <i>E. coli</i> | 25 |
| 2.5.3 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese..... | 26 |
| 2.5.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | 26 |
| 2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 27 |
| 2.5.6 Ortsgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese..... | 27 |
| 2.5.7 Elektroporation von Bakterien | 27 |
| 2.6 Biochemische Standardmethoden | 28 |
| 2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>N. benthamiana</i> | 28 |
| 2.6.2 Proteinbestimmung..... | 28 |
| 2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 28 |
| 2.6.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose („Western-Blot“)..... | 29 |
| 2.6.5 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine | 29 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.7 | Präparation von genomischer DNA aus Kartoffelblättern..... | 30 |
| 2.8 | Nachweis von β -Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen | 30 |
| 2.8.1 | Histochemische Detektion von β -Glucuronidaseaktivität | 30 |
| 2.8.2 | Messung von β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzenextrakten | 31 |
| 2.9 | Transiente Transformation von Protoplasten aus <i>N. tabacum</i> | 32 |
| 2.9.1 | Anzucht von <i>N. tabacum</i> var. Samsun NN | 32 |
| 2.9.2 | Herstellung und Isolierung der Protoplasten | 32 |
| 2.9.3 | Transformation der Protoplasten mittels PEG | 33 |
| 2.10 | Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> mittels Infiltration von <i>A. tumefaciens</i> | 34 |
| 2.10.1 | Anzucht von <i>N. benthamiana</i> (L.)..... | 34 |
| 2.10.2 | Anzucht von <i>A. tumefaciens</i> | 34 |
| 2.10.3 | Infiltration der <i>N. benthamiana</i> - Blätter..... | 35 |
| 2.11 | Transformation von <i>Solanum tuberosum</i> mittels <i>A. tumefaciens</i> | 35 |
| 2.12 | Bildbearbeitung | 36 |
| 3. | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Vektorkonstrukte für die stabile Transformation..... | 37 |
| 3.1.1 | Subklonierung A (Kassette mit Promotor, FLP LBD, Terminator)..... | 38 |
| 3.1.2 | Subklonierung B (Positiv/Negativ-Selektionssystem)..... | 40 |
| 3.1.3 | Subklonierung C (Fremdgen & Terminator) | 41 |
| 3.1.4 | Herstellung der binären Vektoren | 42 |
| 3.2 | Funktionalität der <i>npt II</i> -Fusionsproteine..... | 43 |
| 3.3 | Klonierung einer neuen <i>nptII</i> -Kassette..... | 44 |
| 3.4 | Vergleich der Liganden-Bindungs-Domänen in transienten Tests..... | 46 |
| 3.4.1 | Analyse der binären Konstrukte pMPB7-75 bis pMPB7-80 | 46 |
| 3.4.2 | Analyse der binären Konstrukte pMPB7-98 bis pMPB7-103 | 50 |
| 3.4.3 | Analyse der binären Konstrukte pMPB7-82 bis pMPB7-87 | 52 |
| 3.5 | Analyse der stabil transformierten Kartoffelpflanzen..... | 54 |
| 3.5.1 | Hintergrundaktivität und Induktion der LBD in stabil transformierten Pflanzen | 56 |
| 3.6 | Transiente Auswertung der <i>FRT</i> site-Mutanten | 61 |

| | |
|---|----|
| 4. Diskussion | 68 |
| 4.1 Vektorsystem und Negativ-Selektionsgen | 68 |
| 4.2 Vergleich der Liganden-Bindungs-Domänen | 70 |
| 4.3 Untersuchung der <i>FRT</i> site-Mutanten | 77 |
| 4.4 Ausblick | 80 |
| 5. Zusammenfassung | 83 |
| 6. Anhang | 85 |
| 7. Literaturverzeichnis | 86 |
| Lebenslauf | 95 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| AS | Aminosäure |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BAP | 6-Benzylaminopurin |
| bp (kb) | Basenpaare (Kilobasenpaare) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CD | Cytosin-Desaminase |
| cDNA | komplementäre DNA |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBD | Östrogen-Bindungs-Domäne |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EtOH | Ethanol |
| 5-FC | 5-Fluorocytosin |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| FRT | FLP-Rekombinase Erkennungssequenz |
| GA ₃ | Gibberellinsäure A ₃ |
| GBD | Glucocortikoid-Bindungs-Domäne |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| GOI | Fremdgen |
| GR | Glucocortikoid-Rezeptor |
| GUS | β -Glucuronidase |
| kDa | Kilodalton |
| LBD | Liganden-Bindungs-Domäne |
| MCS | multiple Klonierungsstelle |
| MES | 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure |
| 4MU | 4-Methylumbelliferon |
| 4MUG | 4-Methylumbelliferylglucuronid |
| NAA | 1-Naphtalenessigsäure |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| rec | Rekombinase |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| TK | Thymin-Kinase |
| üN | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| X-Gluc | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylglucuronid |
| var. | Varietät |
| WT | Wildtyp |

1. Einleitung

Seit Jahrhunderten wird immer wieder versucht, Pflanzen gezielt zu veredeln, sodass sie möglichst ertragreich und widerstandsfähig gegen Krankheiten und Umwelteinflüsse sind. Die klassische Pflanzenzüchtung erreicht ihr Ziel durch Kreuzen unterschiedlicher Sorten über mehrere Generationen hinweg. Dieses ist sehr zeitaufwendig und beansprucht zudem häufig zusätzliche Mittel, wie chemische Substanzen oder UV-Strahlung. Die so erzielten Mutationen können zu neuen Eigenschaften führen, bringen aber oft auch unerwünschte Eigenschaften mit sich, die dann durch Rückkreuzung wieder entfernt werden müssen.

Durch die Entwicklung der Gentechnologie und der damit verbundenen Möglichkeit, Pflanzen gezielt mit verbesserten Eigenschaften herzustellen, eröffnen sich neue Perspektiven im Bereich der Pflanzenzüchtung und Pflanzenbiotechnologie. Für die Selektion transgener Pflanzen ist es dabei nach wie vor notwendig, geeignete Marker mit in das pflanzliche Genom einzubringen, um transgene von nicht-transgenen Pflanzen zu unterscheiden. Als Selektionsmarker werden hauptsächlich Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene verwendet, die nach erfolgreicher Selektion überflüssig sind (Yoder und Goldsbrough, 1994).

Verschiedene Gründe sprechen für eine Entfernung dieser Fremd-DNA. So ist bekannt, dass auch bei Homologien nicht-kodierender Sequenzen, wie z.B. Promotorbereichen, die Expression von Fremdgenen ausgeschaltet werden kann (Park *et al.*, 1996; Matzke und Matzke, 1995). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, durch eine Entfernung der Markergene den gleichen Selektionsmarker bei Mehrfach-Transformationen wiederholt anzuwenden. Da die Anzahl einsetzbarer Markergene in den jeweiligen Pflanzenspezies limitiert ist, können somit für die verwendeten Transformationssysteme immer wieder die optimalen Selektionsbedingungen angewendet werden (Cregg & Madden, 1989).

In der Öffentlichkeit ist die Anwendung der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung immer noch umstritten. Dabei steht die Besorgnis um die Sicherheit transgener Pflanzen und die eventuell mit sich bringenden Umweltrisiken, die aus dem Anbau gentechnisch modifizierter Pflanzen resultieren könnten, im Vordergrund. Hinzu kommt, dass seit Oktober 2002 eine neue EU-Freisetzungsrichtlinie (2001/18/EG)

rechtsgültig wurde, durch die die Zulassung und Freisetzung von gentechnisch veränderten Pflanzen mit Antibiotikaresistenz-Markern erheblich eingeschränkt wird.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit die Grundlage für die nachhaltige Etablierung eines in der Praxis anwendbaren Systems zur Entfernung von Markergenen gelegt werden, dass auch im Hinblick auf eine kommerzielle Anwendung geeignet ist.

1.1 Markergen-Entfernung in Pflanzen

Verschiedene Methoden wurden bereits zur Markergen-Entfernung in Pflanzen eingesetzt. Bei der Cotransformation und der intra-genomischen Relokalisation erfolgt die Entfernung des Markergens durch Auskreuzen oder Selbstbestäubung der Primärtransformanten. Wegen der hierfür erforderlichen Samenbildung sind diese Ansätze je nach Pflanzenart recht zeitaufwendig. Weiterhin sind Methoden, die über Rückkreuzen zum Entfernen des Markers führen, problematisch bei Pflanzen, die sich hauptsächlich vegetativ vermehren, wie z.B. Kartoffeln.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung Markergen-freier transgener Pflanzen bieten Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme. Sie bestehen aus zwei Komponenten, einer Rekombinase und ihrer Erkennungssequenz (Kilby *et al.*, 1993; Odell & Russell, 1994; Sauer, 1994; Ow & Medberry, 1995). Verschiedene Rekombinationssysteme wurden schon in Pflanzen getestet. Die bekanntesten und am besten charakterisierten Systeme sind das Cre/*loxP*-System aus dem Bakteriophagen P1 (Odell *et al.*, 1990; Dale & Ow, 1991; Bayley *et al.*, 1992; Stuurmann *et al.*, 1998; Gleave *et al.*, 1999; Srivastava & Ow, 2001), das FLP/*FRT*-System des 2 µm-Plasmids aus *Saccharomyces cerevisiae* (Lyznik *et al.*, 1993; Lloyed & Davies, 1994; Sonti *et al.*, 1995; Kilby *et al.*, 1995; Bar *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1999; Gidoni *et al.*, 2001,), das R/RS-System vom pSR1-Plasmid aus *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi *et al.*, 1995; Sugita *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 2002) und das Gin/*gix*-System des Phagen Mu (Maeser & Kahmann, 1991). Im Gegensatz zur Cotransformation oder intra-genomischen Relokalisation ist die Sequenz-spezifische Rekombination auch bei Pflanzen anwendbar, die sich vegetativ vermehren (Ow, 2001). In Tabelle 1.1 ist eine vergleichende Übersicht der vier beschriebenen Rekombinationssysteme dargestellt.

Tab.1.1 Vergleich der vier Sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme, deren Funktionalität in pflanzlichen Organismen gezeigt werden konnte [Verändert nach Odell & Russell, 1994].

| | Cre/ <i>loxP</i> | FLP/ <i>FRT</i> | R/ <i>RS</i> | Gin/ <i>gix</i> |
|---|--|--|--|----------------------------------|
| Organismus | Bakteriophage P1 (Prokaryont) | 2 µm-Plasmid aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Eukaryont) | pSR1-Plasmid aus <i>Zygosaccharomyces cerevisiae</i> (Eukaryont) | Bakteriophage Mu (Prokaryont) |
| Rekombinase | Cre: 38 kDa | FLP: 48 kDa | R: 56 kDa | Gin: 21.7 kDa |
| Rekombinase-Familie | Integrase | Integrase | Integrase | Invertase |
| Erkennungssequenz | <i>loxP</i> : 34 bp | <i>FRT</i> : 48 bp | <i>RS</i> : ≤ 58 bp | <i>gix</i> : 34 bp |
| Funktionalität in nicht-pflanzlichen Organismen | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> Säugetierzellen <i>Drosophila</i> Maus | <i>E. coli</i> <i>S. cerevisiae</i> Säugetierzellen <i>Drosophila</i> Maus | <i>S. cerevisiae</i> | nicht getestet |
| Funktionalität in Pflanzen | Tabak <i>A. thaliana</i> Tomate Mais Weizen | Tabak <i>A. thaliana</i> Mais Reis | Tabak <i>A. thaliana</i> | Tabak <i>A. thaliana</i> |

Die meisten Untersuchungen zur Rekombination in Pflanzen wurden mit Cre/*loxP* und FLP/*FRT* durchgeführt (zur Übersicht: Odell & Russel, 1994; Ow & Medberry, 1995). In dieser Arbeit wurde als Grundlage zur Entfernung der Markergene das FLP/*FRT*-System eingesetzt. Es hat im Vergleich zum Cre/*loxP*-System den Vorteil, dass es einem eukaryotischen Organismus entstammt und die FLP-Rekombinase durch ein Kernlokalisierungssignal gezielt in den Zellkern transportiert wird. Es ist anzunehmen, dass sie dadurch eine höhere Effizienz in pflanzlichen Organismen aufweist als Rekombinasen aus prokaryotischen Systemen (Lloyd & Davies, 1994). Darüber hinaus besitzen die FLP- und Cre-Rekombinase verschiedene Temperatur-optima. Das der FLP liegt bei etwa 30°C, die Cre ist bei Temperaturen ab 37°C am effizientesten (Buchholz *et al.*, 1996). Die Pflanzen wurden in dieser Arbeit bei Temperaturen von 23°C bis 26°C kultiviert, sodass die Überlegung nahe liegt, dass die FLP-Rekombinase mit einem niedrigeren Temperaturoptimum effizientere Rekombinationsraten in diesem System erzielen könnte als die Cre-Rekombinase.

1.2 Das FLP/*FRT*-System aus *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der FLP-Rekombinase handelt es sich um ein 48 kDa großes Protein aus vier Untereinheiten, das von einem Gen des 2 μ m-Plasmids aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert wird und spezifisch an eine 48 bp lange Sequenz, die „FLP recognition target site“ (*FRT*site), bindet. Ist ein DNA-Segment zwischen zwei Erkennungssequenzen eingeschlossen, wird es je nach Orientierung dieser Sequenzen durch die Rekombinase invertiert oder deletiert (Abb. 1.1 [a], [b]; zur Übersicht: Cox, 1988; Kilby *et al.*, 1993).

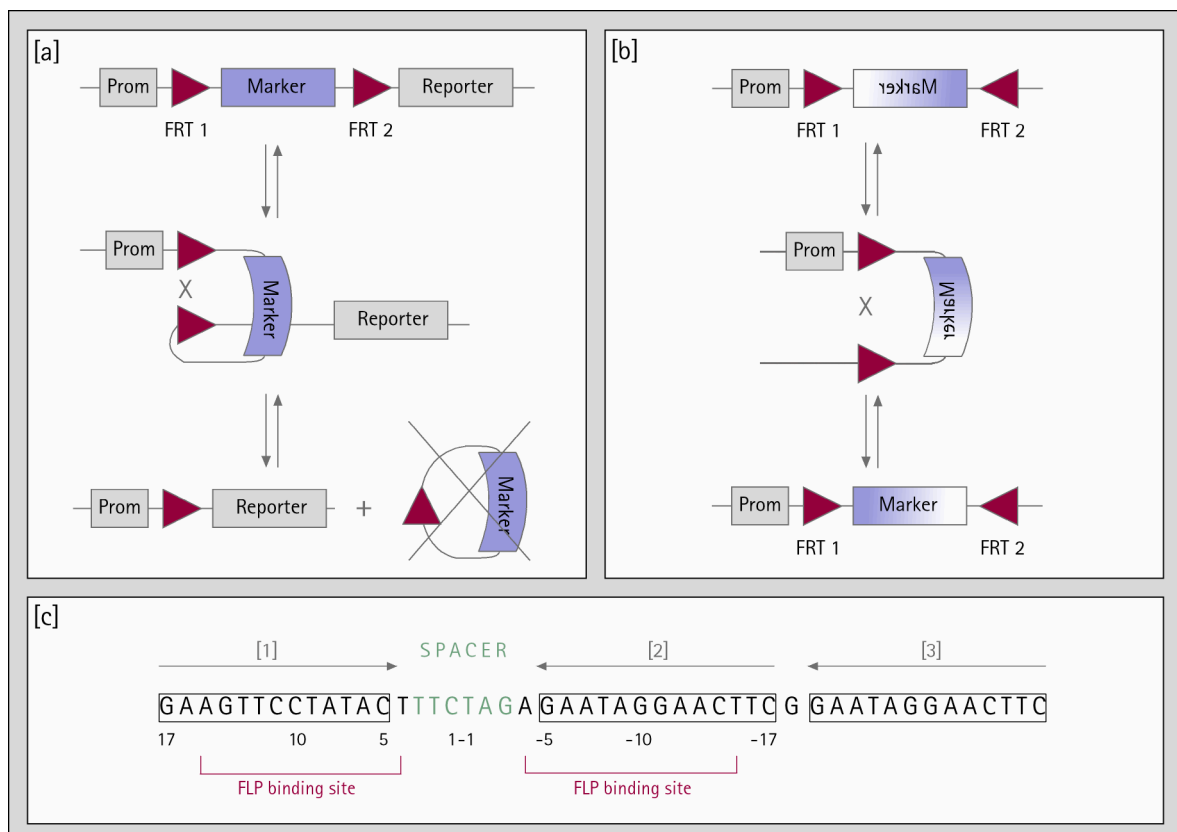


Abb. 1.1 [a] & [b] Schematische Darstellung der FLP-vermittelten Sequenz-spezifischen Rekombination. Die FLP-Rekombinase erkennt spezifisch eine kurze Sequenz, die FLP recognition target (*FRT*) site. Die Rekombination erfolgt zwischen zwei dieser Erkennungssequenzen. Sind diese in gleicher Orientierung angelegt [a], kommt es zur Deletion der dazwischen liegenden Sequenz. Befinden sich die *FRT*sites in entgeger gerichteter Orientierung zueinander [b], wird die dazwischen liegende Sequenz invertiert. [c] Aufbau der Wildtyp-*FRT*site. Die Zahlen geben die Positionen der Basen innerhalb der *FRT*site an.

Jede *FRT*site besteht aus drei 13 bp-Wiederholungen, von denen sich die zweite und dritte in gleicher Orientierung zueinander befinden und durch eine Base voneinander getrennt werden. Die erste Wiederholungssequenz liegt in entgegengesetzter Orientierung zu den beiden anderen und wird durch einen 8 bp langen, asymmetrischen Spacer von den beiden anderen separiert (Abb. 1.1 [c]). An jede der 13 bp-Wiederholungen der *FRT*site bindet spezifisch ein Rekombinase-Monomer und

spaltet den gegenüberliegenden DNA-Strang an den Grenzen der Spacer-Region. Die dritte Sequenzwiederholung ist dabei für den eigentlichen Rekombinationsvorgang ohne Funktion (Andrews *et al.*, 1985). Viele Untersuchungen, die sich mit Mutationsstudien innerhalb der *FRT*sites befassten, setzten deshalb minimale *FRT*sites ein, in denen die dritte *FRT*site deletiert wurde (Senecoff & Cox, 1986; Gates & Cox, 1988; Huang *et al.*, 1991; Lyznik *et al.*, 1993; Luetke & Sadowski, 1998; Storici *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2001).

Durch Mutationsstudien in *E. coli* und *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die zentralen 6 bp der Spacer-Region während der Rekombination mit dem FLP-Protein nicht in Kontakt kommen und Veränderungen innerhalb dieser Sequenz toleriert werden (Senecoff & Cox, 1986; Senecoff *et al.*, 1988; zur Übersicht: Cox, 1988). In weiteren Experimenten zeigten Umlauf & Cox (1988) in *S. cerevisiae*, dass bei Verwendung homologer mutierter *FRT*sites ähnliche Effizienzen wie bei der Wildtyp-*FRT*site zu beobachten waren, zwischen heterologen *FRT*sites aber keine oder nur sehr geringe Rekombination stattfindet. Schlake & Bode (1994) nutzten diese Beobachtung, um durch die Kombination von Wildtyp- und mutierten *FRT*sites homologe Rekombination hervorzurufen. In dieser Arbeit sollte erstmals die Funktionalität der *FRT*site-Mutanten in Pflanzen getestet werden. Durch Kombination von Wildtyp-*FRT*site und mutierter *FRT*site sollte ein System etabliert werden, dass Mehrfachtransformationen mit ein und demselben Selektionsmarker ermöglicht.

1.3 Regulation der FLP-Rekombinase

Um zu verhindern, dass die FLP-Rekombinase bereits vor der Selektion der transgenen Pflanzen aktiv ist, muss eine Regulation erfolgen, die eine gezielte Aktivierung der Rekombinase zum gewünschten Zeitpunkt ermöglicht. Verschiedene Regulationssysteme wurden bereits zur Expression von Transgenen entwickelt.

Die generelle Strategie, mit der chemisch induzierbare Expressionssysteme für Pflanzen entwickelt wurden, basiert auf der Induktion von Promotoren oder der Verwendung von regulatorischen Elementen aus nichtpflanzlichen Organismen (zur Übersicht: Gatz & Lenk, 1998). Das erste chemisch regulierbare Expressionssystem unter Verwendung von regulatorischen Elementen aus nichtpflanzlichen Organismen wurde auf der Basis des bakteriellen Tetrazyklinrepressors (TetR) von Gatz & Quail

(1988) entwickelt. Die effiziente Regulation eines 35S Promotors durch den TetR in transgenem Tabak zeigten Gatz *et al.* (1992) und Röder *et al.* (1994). Durch die Fusion des TetR mit der aktivierenden Domäne des viralen Proteins 16 (VP16) aus *Herpes simplex* entstand ein aktivierender Transkriptionsfaktor (Weinmann *et al.*, 1994). Die Funktionalität dieses Systems wurde von Weinmann *et al.* (1994) in Tabak und Gil und Green (1996) in *Arabidopsis* gezeigt.

Die Anwendung tierischer Steroidhormonrezeptoren als Regulationselemente führte zur Entwicklung neuer induzierbarer Expressionssysteme in Pflanzen (zur Übersicht: Zuo & Chua, 2000). Steroide besitzen den Vorteil, dass sie eine sehr hohe Spezifität und Bindungsaffinität zu ihren Rezeptoren aufweisen (Evans, 1988). Die Rezeptoren sind aus den sechs Domänen A-F aufgebaut (Abb. 1.2). Dabei ist die E-Domäne die eigentliche Bindungsstelle für das Hormon. Sie vermittelt neben der Bindung des Liganden noch weitere Funktionen, wie z.B. Dimerisierung, Bindung eines 90 kDa Hitzeschock-Proteins, transkriptionelle Aktivierung u.a. (Nichols *et al.*, 1997). Die N-terminalen Domänen A und B sind in die transkriptionelle Antwort verschiedener Hormon-induzierter Promotoren involviert (Webster *et al.*, 1988). Die C-Domäne enthält zwei Zinkfinger, über die Sequenz-spezifische DNA-Bindung stattfindet. Die Domänen C und E sind hochkonserviert und werden durch eine variable, nicht konservierte D-Domäne voneinander getrennt. Über die Funktion der F-Domäne ist bisher noch nichts bekannt. Darüber hinaus wurden zwei Transaktivator-Domänen AF-1 und AF-2 beschrieben (Gronemeyer & Laudet, 1995).

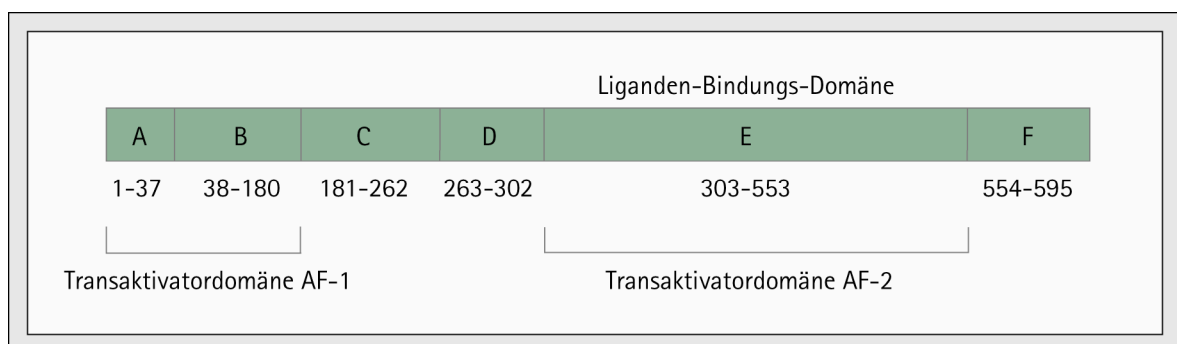


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der sechs Domänen von Steroidhormonrezeptoren. Die Zahlen verweisen auf die jeweiligen Basenpositionen [Verändert nach Gronemeyer & Laudet, 1995].

Auf der Grundlage von Steroidhormonrezeptoren wurden verschiedene induzierbare Expressionssysteme in Pflanzen entwickelt, bei denen die Regulation der Rekombinase-Aktivität auf Ebene der Transkription stattfindet. Schena *et al.* (1991)

zeigten, dass ein System bestehend aus dem Glucocortikoidrezeptor (GR) und dem „Glucocortikoid response element“ in transienten Tests mit Tabak-Suspensionskulturen prinzipiell funktionierte. In *Arabidopsis* und Tabak konnte gezeigt werden, dass durch Fusion der Liganden-Bindungs-Domäne des GR mit einem pflanzlichen Transkriptionsfaktor dessen Aktivität über Zugabe des Hormons reguliert werden konnte (Lloyd *et al.*, 1994; Aoyama *et al.*, 1995; Aoyama & Chua, 1997). Ouwerkerk *et al.* (2001) wiesen dann die Funktionalität des von Aoyama und Chua (1997) entwickelten Glucocortikoid-induzierten Expressionssystems in Reis nach.

Auch verschiedene Östrogen-induzierte Expressionssysteme wurden erfolgreich in Pflanzen getestet. So verwendeten Bruce *et al.* (2000) eine Fusion der Transaktivator-Domänen des Transkriptionsfaktors C aus Mais und des humanen Östrogenrezeptors. Zuo *et al.* (2000) entwickelten ein Östrogen-induziertes Expressionssystem, bei dem die DNA-Bindungs-Domäne des bakteriellen Repressors *LexA* mit der Transaktivator-Domäne von VP16 und der Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) des humanen Östrogenrezeptors fusioniert wurde (XVE-System). Durch die Kombination des XVE-Systems mit dem *Cre/loxP*-System wurde von Zuo *et al.* (2001) ein effizientes System zur Entfernung von DNA-Sequenzen in *Arabidopsis* entwickelt.

Die bisher in Pflanzen getesteten Rekombinationssysteme weisen keine 100 %ige Effizienz bei der Markergen-Entfernung auf. So erzielten Lyznik *et al.* (1995) in Mais eine Rekombinationseffizienz von 20-25 % in transienten Assays und von etwa 17 % in stabil transformierten Zellen. Davies *et al.* (1999) erzielten in Tabak Rekombinationseffizienzen zwischen 12 % und 55 %. Selbst Zuo *et al.* (2001), die das XVE-System mit dem *Cre/loxP*-System kombinierten, erreichten in *Arabidopsis* nur Effizienzen zwischen 29 % und 66 %. Aus diesem Grund scheint die Weiter- bzw. Neuentwicklung induzierbarer Expressionssysteme sinnvoll.

Logie & Stewart (1995) entwickelten ein ganz neues induzierbares System (recLBD-System), bei dem erstmals direkt die Aktivität einer Rekombinase reguliert werden konnte. Dieses System basiert auf der Fusion einer Rekombinase mit der Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) eines Steroidrezeptors. LBDs von Steroidrezeptoren bilden Proteinkomplexe mit Hitzeschock-Proteinen und diese dissoziieren erst, wenn die entsprechenden Hormone an die Domänen binden (zur Übersicht: Picard, 1994). Durch die Fusion bleibt die Rekombinase solange inaktiv, bis der Ligand hinzugefügt

wird. Die Zugabe des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung, und der Komplex mit dem Hitzeschockprotein löst sich auf (Abb. 1.3). Somit wird es möglich, den Zeitpunkt der Rekombinaseaktivität durch Zugabe des Liganden zu steuern.

Logie & Stewart (1995) zeigten in *E. coli* und Säugertierzellen, dass die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der LBD des Östrogenrezeptors in Abwesenheit des Hormons eine niedrige Hintergrundaktivität aufwies und erst nach Zugabe des entsprechenden Hormons ein starker Anstieg der FLP-Aktivität beobachtet werden konnte. In Mutationsstudien der Östrogen-Bindungs-Domäne (EBD) konnten sie nachweisen, dass die Länge der D-Domäne zwischen FLP und EBD sowohl einen Einfluss auf die Aktivierung der Rekombinase durch verschiedene Liganden hat als auch die Hintergrundaktivität der Rekombinase beeinflusst (Nichols *et al.* 1997). Der Vergleich dreier Fusionsproteine mit unterschiedlich langer EBD zeigte bei der Wildtyp-EBD (Aminosäuren 251-595; vgl. Abb. 1.2) eine Hintergrundaktivität der FLP. Der Deletionsklon EBD₂₈₆ (Aminosäuren 286-595) zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine stark reduzierte, der Klon EBD₃₀₄ (Aminosäuren 304 - 595) keine Hintergrundaktivität der FLP-Rekombinase. Die vollständige Deletion der D-Domäne (EBD₃₀₄) führte aber auch dazu, dass die FLP-Rekombinase nicht mehr durch den Liganden induziert werden konnte.

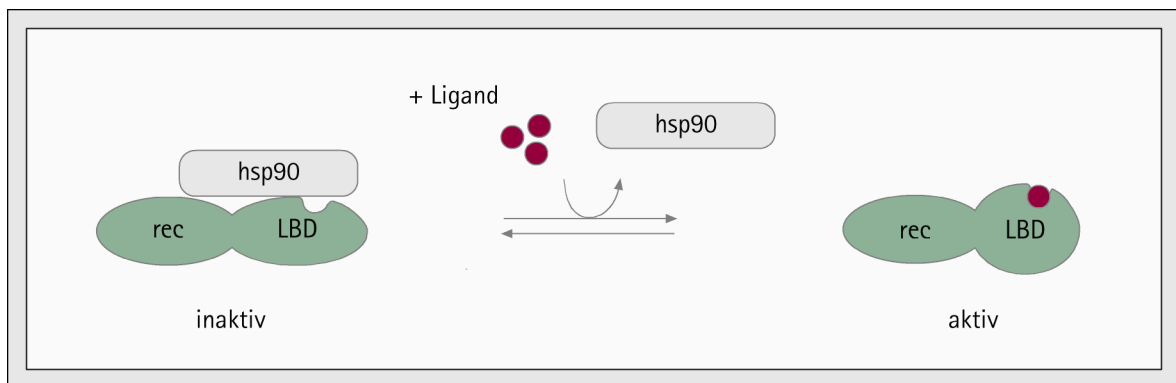


Abb. 1.3 Aktivierung der FLP-Rekombinase (rec) durch Zugabe eines Liganden. Das Fusionsprotein (recLBD) ist durch Anlagerung des Chaperons hsp90 inaktiv. Durch Zugabe des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, so dass sich das Chaperon vom Komplex löst und das Enzym seine vollständige Aktivität zurückerhält. rec: Rekombinase; LBD: Liganden-Bindungs-Domäne; hsp: Hitzeschock-Protein [verändert nach Schwenk *et al.*, 1998].

Durch die Fusion der FLP-Rekombinase mit der LBD eines Steroidrezeptors ist eine direkte Regulation des Enzyms auf Proteinebene möglich. Die Funktionalität eines solchen induzierbaren Systems wurde bisher in pflanzlichen Organismen noch nicht untersucht und soll in der vorliegenden Arbeit getestet werden. Hierzu wurden drei

verschiedene Liganden-Bindungs-Domänen mit der FLP-Rekombinase fusioniert. Sie sollen im Bezug auf ihre verschiedenen Hintergrundaktivitäten analysiert werden.

1.4 Negativ-Selektionsmarker

Die verschiedenen Untersuchungen zum recLBD-System zeigen, dass auch die Regulation der FLP-Rekombinase über die Fusion mit den Liganden-Bindungs-Domänen von Steroidrezeptoren nicht zu einem 100 %igen Markergen-freien Organismus führen (Logie & Stewart, 1995; Feil *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 1997; Angrand *et al.*, 1998; Logie *et al.*, 1998; Schwenk *et al.*, 1998). Es ist anzunehmen, dass dieses auch für Pflanzen zutreffen wird. Daher sind weitere Kontrollmechanismen notwendig, um eine 100 %ige Markergen-freie Pflanze gewährleisten zu können.

Eine Möglichkeit bieten so genannte Negativ-Selektionsmarker. Die Expression solcher Negativ-Selektionsgene verursacht unter spezifischen Entwicklungs- oder Umweltbedingungen den Zelltod (zur Übersicht: Lal *et al.*, 2000). Negativ-Selektionsgene werden seit Mitte der achtziger Jahre erfolgreich in der Krebs-Therapie angewendet (zur Übersicht: Freeman *et al.*, 1996). Aber auch in pflanzlichen Organismen konnten die Funktionalität dieser Gene gezeigt werden (Mariani *et al.*, 1992; Renckens *et al.*, 1992; Thykjær *et al.*, 1997; Strittmatter *et al.*, 1995).

Man unterscheidet zwischen nicht-konditionalen und konditionalen Negativ-Selektionsmarkern. Die Expression nicht-konditionaler Negativ-Selektionsmarker führt zum direkten Zelltod, es sei denn, die Regulation erfolgt durch Gewebe-spezifische oder induzierbare Promotoren. Verschiedene nicht-konditionale Markergene wurden in höheren Pflanzen untersucht: Das Diphtherie-Toxigen aus *Corynebacterium* wurde von Koltunow *et al.* (1990) in Tabak und von Czakó *et al.* (1992) in *Arabidopsis* erfolgreich getestet. Weiterhin wurde das Endotoxin A-Gen aus *Pseudomonas* in Raps von König *et al.* (1992) und das Anti-*npt II* Gen in Tabak von Xiang & Guerra (1993) eingesetzt.

Konditionale Markergene kodieren für ein Enzym, das die nicht-toxische Vorstufe eines Wirkstoffs in seinen cytotoxischen Metaboliten umwandelt. Das Substrat wird von außen appliziert, und erst nach Umwandlung der Vorstufe in den Wirkstoff kommt es zum Zelltod (Abb. 1.4). Neben Arbeiten mit einer Amidohydrolase (Depicker *et al.*, 1988; Karlin-Neuman *et al.*, 1991; Beclin *et al.*, 1993) und einer

Monooxygenase (O'Keefe *et al.*, 1994), befassten sich zahlreiche Untersuchungen mit der Cytosin-Desaminase (Austin & Huber, 1992) und der Thymidin-Kinase (Bradshaw & Deininger, 1984).

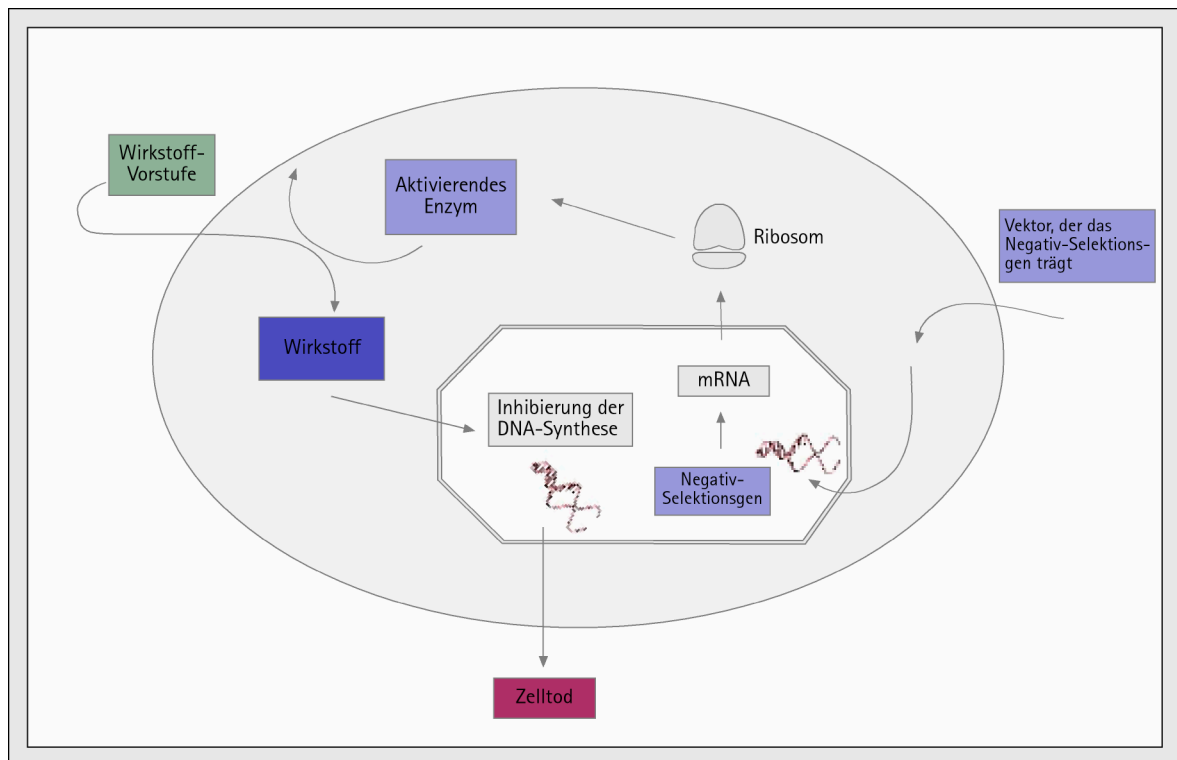


Abb. 1.4 Prinzip des durch konditionale Negativ-Selektionsgene hervorgerufenen Zelltods. Das Negativ-Selektionsgen wird mittels Transformation in die Zelle transferiert und dort exprimiert. Nach Zugabe der Wirkstoff-Vorstufe kann das Enzym diese in den cytotoxischen Metaboliten umwandeln was den Zelltod hervorruft. [verändert nach Lal *et al.*, 2000]

Die Thymidin-Kinase (TK), die vom *tk*-Gen aus dem *Herpes simplex*-Virus kodiert wird, katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Thymidin über Thymidin-5'-Monophosphat zu Thymidin-5'-Triphosphat, das für die DNA-Synthese benötigt wird. Nach Applikation der Wirkstoff-Vorstufe Ganciclovir wird dieses durch die TK in seine cytotoxischen Di- und Triphosphate umgewandelt, die über die Inhibierung der DNA-Polymerase den Zelltod hervorrufen (zur Übersicht: Lal *et al.*, 2000). Die Thymidin-Kinase wird in der Medizin hauptsächlich zur Krebs-Therapie eingesetzt (Freeman *et al.*, 1996). In Pflanzen wurde die TK als Negativ-Selektionsmarker erstmals von Czakó & Márton (1994) und Czakó *et al.* (1995) zur Untersuchung homologer Rekombinationsereignisse bei „gene targeting“-Experimenten in *Arabidopsis* und Tabak getestet.

Die Cytosin-Desaminase (CD), die vom *codA*-Gen aus *E. coli* kodiert wird, wandelt die nicht-toxische Wirkstoff-Vorstufe 5-Fluorocytosin (5-FC) in den toxischen

Metaboliten 5-Fluorouracil (5-FU) um. 5-FU inhibiert die Thymidilat-Synthese und die dadurch hervorgerufene Störung der DNA- und RNA-Synthese führt dann zum Zelltod (zur Übersicht: Lal *et al.*, 2000). Seitdem die CD kloniert und sequenziert ist (Austin & Huber, 1992), wurde sie in der Medizin als Alternative für die TK zur Bekämpfung von Krebs erforscht und erfolgreich eingesetzt. Die Funktionalität der CD als Negativ-Selektionssystem in Säugertierzellen konnte erstmals von Mullen *et al.* (1992) gezeigt werden.

In pflanzlichen Organismen hat sich die Cytosin-Desaminase bisher als effizientestes und zuverlässigstes Markergen unter den bisher aufgeführten Negativ-Selektionsmarkern behauptet (Übersicht in Koprek *et al.*, 1999). Nach der erstmaligen Beschreibung durch Stougaard (1993) folgten eine Anzahl an Studien in unterschiedlichen Pflanzen, wie z.B. in *Arabidopsis* (Perera *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1995; Gallego *et al.*, 1999), in Tabak (Stougaard, 1993; Risseuw *et al.*, 1997; Schlaman & Hooykaas, 1997; Serino & Maliga, 1997), in *Lotus japonicus* (Stougaard, 1993; Thykjær *et al.*, 1997), in Gerste (Koprek *et al.*, 1999) und in Reis (Dai *et al.*, 2001). In allen Pflanzen konnte die Eignung der CD als Negativ-Selektionsmarker gezeigt werden. In Kartoffeln wurde die CD noch nicht getestet. Im Rahmen dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Negativ-Selektion nicht vorgesehen. Da aber die Grundlage für ein in der Praxis anwendbares System gelegt werden sollte, und ein weiteres Selektionssystem notwendig ist, um eine 100 %ige Markergen-freie Pflanzen zu erhalten, wurden die Konstrukte mit allen hierzu benötigten Bausteinen kloniert.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Grundlage für ein neues System zur Entfernung von Markergenen in transgenen Pflanzen zu legen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der Überprüfung der Funktionalität einer bisher noch nicht in Pflanzen etablierten direkten Regulation der Aktivität eines Enzyms über die Fusion mit der Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) von Steroidrezeptoren. Durch die Fusion der FLP-Rekombinase mit verschiedene LBDs, sollte der für dieses System am besten geeignete Steroidrezeptor identifiziert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Systems, das für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden kann. *FRT*site-Mutanten sollten hierzu in verschiedenen Kombinationen in transienten Tests analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Ausstattung

Tab. 2.1: Liste der verwendeten Geräte und Hersteller/Bezugsquellen

| Gerät | Hersteller |
|------------------------------------|--|
| Fluorimeter Spectra Max Gemini | Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA |
| Polyacrylamidgelkammern XCell II™ | Novex, San Diego, CA, USA |
| Homogenisator RW16 basic | IKA, Labortechnik |
| Mastercycler® gradient | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroskope & Zubehör: | |
| Mikroskopvideokamera Sony MC-3254 | ATV-Horn, Aalen |
| Zeiss, Axioskop 2 | Carl Zeiss, Oberkahlen |
| Zeiss, Axiovert S100 | Carl Zeiss, Oberkahlen |
| Osmomat 030 | Gonotec, Berlin |
| ELISA-Photometer Spectra MAX 340PC | Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA |

Die computergestützten Auswertungen aller Sequenzdaten wurden mit dem Macintosh Computersystem unter Verwendung des Programmes DNA STAR™ (LaserGene) durchgeführt.

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|-----------------------------|
| Agarose | Seakem, Rockland, USA |
| Ampicillin (Amp) | Duchefa, Haarlem, NL |
| 6-Benzylaminopurin (BAP) | Duchefa, Haarlem, NL |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-glucuronid (X-Gluc) | Duchefa, Haarlem, NL |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Cefotaxim | Duchefa, Haarlem, NL |
| Cellulase „Onozuka R-10“ | Serva, Heidelberg |
| 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon (Acetosyringon) | Sigma-Aldrich, Steinheim |

| Chemikalie | Hersteller |
|--|--|
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 17 β -Estradiol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 5-Fluorocytosin (5-FC) | Lancaster synthesis, Eastgate, Morecaumbe, GB |
| 9 α -Fluoro-16 α -methylprednisolon (Dexamethason) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Gibberellinsäure A ₃ (GA ₃) | Duchefa, Haarlem, NL |
| I-Block-Reagenz | Tropix, Bedford, MA, USA |
| Kanamycin (Km) | Duchefa, Haarlem, NL |
| Kao-Salzmischung | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kao-Vitamin-Lsg. (100x) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Macerozym R-10 | Duchefa, Haarlem, NL |
| 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4MUG) | Duchefa, Haarlem, NL |
| Naphtylelessigsäure (NAA) | Duchefa, Haarlem, NL |
| p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| NuPage™ Gel | Invitrogen, Karlsruhe |
| Protran® (Nitrocellulose, 0.2 μ M) | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Rifampicin (Rif) | Duchefa, Haarlem, NL |
| SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard | Invitrogen, Karlsruhe |
| Spectinomycin (Spec) | Duchefa, Haarlem, NL |
| Streptomycin (Strep) | Duchefa, Haarlem, NL |
| Tetrazyklin (Tet) | Duchefa, Haarlem, NL |
| Zeatinribosid (Zea) | Duchefa, Haarlem, NL |
| verwendete Kits: | |
| Concert™ Rapid Miniprep System | Life Technologies, Karlsruhe |
| pGEM®-T Easy Vector Systems | Promega, Mannheim |
| DNeasy™ Plant Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAfilter® Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene Europe Ltd., Amsterdam, NL |

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von den Firmen Acros, Aldrich, Baker, Boehringer, Eurobio, Fluka, Gibco, Merck, Pharmacia, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen.

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Enzyme & Antikörper

Tab. 2.3: Bezeichnung und Sequenzen der verwendeten Enzyme und Antikörper

| Enzyme/Antikörper | Hersteller |
|---|--|
| AffiniPure Rat Anti-Mouse IgG AP-konjugiert | Dianova GmbH, Hamburg |
| AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG AP-konjugiert | Dianova GmbH, Hamburg |
| GFP-Monoclonal Antibody | Clontech, Palo Alto, CA, USA |
| Anti- β -Glucuronidase Rabbit IgG | Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA |
| Klenow-Enzym (10U/ μ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Restriktionsendonukleasen (10U/ μ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/ μ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4-DNA-Ligase (1U/ μ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4-DNA-Polymerase (5U/ μ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

2.3.2 Oligonukleotide

Tab. 2.4: Beschreibung der verwendeten Oligonukleotide

| Name | Basensequenz | Länge |
|-------------------|--|---------|
| Mutageneseprimer: | | |
| BsiWI sense mut: | 5'- CAT CCT ACA TAA ATA GAC GCG TAC GAT GAT CTA GAG TCG AGA AG -3' | (44mer) |
| BsiWI rev mut: | 5'- CTT CTC GAC TCT AGA TCA TCG TAC GCG TCT ATT TAT GTA GGA TG -3' | (44mer) |
| XbaI sense: | 5'- CAT CAA AAG TGA CTG CCT TAT CTA GAA TGG TTG CCT TAA AG -3' | (41mer) |
| XbaI as: | 5'- CTT TAA GGC AAC CAT TCT AGA TAA GGC AGT CAC TTT TGA TG -3' | (41mer) |
| BstXI-Top: | 5'- CGG TAT TAA CTT TGT CGC TAA CCC GCT GGT CAA TAT TC -3' | (38mer) |
| BstXI-Bottom: | 5'- GAA TAT TGA CCA GCG GGT TAG CGA CAA AGT TAA TAC CG -3' | (38mer) |
| PCR-Primer: | | |
| NosNPT-XhoI: | 5'- GTC CTC GAG GTC GCC TAA GGT CAC TAT CAG -3' | (30mer) |
| NosNPT-HindIII: | 5'- GTC AAG CTT GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG -3' | (30mer) |
| TK-HindIII: | 5'- GTC AAG CTT ATG GCT TCG TAC CCC GGC C -3' | (28mer) |

| Name | Basensequenz | Länge |
|----------------------|--|---------|
| TK-EcoRI | 5'- GTC GAA TTC TCA GTT AGC CTC CCC CAT CTC -3' | (30mer) |
| NosTer-EcoRI: | 5'- GTC GAA TTC CCA GAT CGT TCA AAC ATT TGG C -3' | (31mer) |
| Nos Ter-BamHI: | 5'- GTC GGA TCC ATC AGC TTG CAT GCC GGT C -3' | (28mer) |
| codA-HindIII: | 5'- GTC AAG CTT ATG TGG AGG CTA ACA GTG TC -3' | (29mer) |
| codA-EcoRI: | 5'- GTC GAA TCC TCA ACG TTT GTA ATC GAT GGC -3' | (30mer) |
| GUS-KpnI: | 5'- CGG GGT ACC ATG GTC CGT CCT GTA GAA AC -3' | (29mer) |
| GUS-NsiI: | 5'- CCA ATG CAT GTA CAT ATA AGT AGT AGG GTA C -3' | (31mer) |
| MasProm Sal up: | 5'- GAC TGT CGA CTG GTG TAT CGA GAT TGG -3' | (27mer) |
| MasProm Sal up1: | 5'- GAG TGT CGA CCT GAA AAG GCG AAA TGG -3' | (27mer) |
| MasProm Hind rev: | 5'- GAC TAA GCT TCA CGT GTG GAA GAT ATG -3' | (27mer) |
| G4 Ter Sal/Hind rev: | 5'- GAC TAA GCT TGT CGA CGT ACC CGA AAT ATA AAC AAC TTG TAA TG -3' | (44mer) |
| Linkerligation: | | |
| FRT1/NcoI: | 5'- CAT GGG AAG TTC CTA TTC TCT AGA AAG TAT AGG AAC TTC G -3' | (40mer) |
| FRT1/Sall: | 5'- TCG ACT AAG TTC CTA TAC TTT CTA GAG AAT AGG AAC TTC C -3' | (40mer) |
| FRT2-BamHI: | 5'- GAT CCG AAG TTC CTA TTC TCT AGA AAG TAT AGG AAC TTC GC -3' | (41mer) |
| FRT2-NotI: | 5'- GGC CGC GAA GTT CCT ATA CTT TCT AGA GAA TAG GAA CTT CG -3' | (41mer) |

2.3.3 Plasmide

Tab. 2.5: Beschreibung der verwendeten Plasmide (Amp^R: Ampicillinresistenz, gfp: grün fluoreszierendes Protein, Gus: β -Glucuronidase, Km^R: Kanamycinresistenz, MCS: multiple Klonierungsstelle, Spec^R: Spectinomycinresistenz, Str^R: Streptomycinresistenz, Sul^R: Sulfonamidresistenz, TL: Translationsverstärker, *nptII*: Nopalinsynthase-Gen, pBSK: pBluescript SK, EBD: Östrogen-Bindungs-Domäne, GBD: Glucocortikoid-Bindungs-Domäne, OCS: Octopinsynthase-Gen, NOS: Nopalinsynthase-Gen)

| Name | Beschreibung | Referenz |
|---------------------------|--|---|
| pBSK | Sequenziervektoren (T3/T7-Promotoren) Amp ^R ; SK und KS tragen MCS in umgekehrter Orientierung | Stratagene |
| pGEM [®] -T Easy | T-Vektor zur PCR-Klonierung; Amp ^R | Promega |
| pKO Select TK | Amp ^R ; Donorplasmid für die Thymidin-Kinase | Stratagene |
| pCATgfp | <i>gfp</i> unter Kontrolle des 2x35S TL-Promotor; Amp ^R ; | G. Jach, MPIZ Köln |
| pLH9000 | binärer Vektor mit MCS; Str ^R ; Spec ^R | Hausmann & Töpfer, 1999 |
| pBKC Cre-GR (1747 T) | pBK-CMV-Derivat; Km ^R ; Donorplasmid für die Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne (GBD) | Stewart <i>et al.</i> , EMBL Heidelberg |
| pGEM EBD ₂₇₇ | pGEM [®] -T Easy; Amp ^R ; Donorplasmid für die verkürzte Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne (EBD ₂₇₇) | Stewart <i>et al.</i> , EMBL Heidelberg |

| Name | Beschreibung | Referenz |
|------------|--|---|
| FLP WT 251 | pRS 315-Derivat; Amp ^R ; Donorplasmid für die Wildtyp Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne (EBD ₂₅₁) | Stewart <i>et al.</i> , EMBL Heidelberg |
| pSR 8-30 | pPCV701-Derivat; Amp ^R ; Donorplasmid für PCR-Amplifikation von Nos-Promotor, NptII-Gen und g4-Terminator | K. Düring, 1994 |
| pUK 403 | Donorplasmid für PCR-Amplifikation des GUS-Gens mit OCS-Terminationssignal | Köhler <i>et al.</i> , 1996 |
| pMPB1-28 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor, 35S-Terminator; MCS | S. Haupt & I. Wenderoth, MPB Cologne GmbH |
| pMPB5-38 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor, 35S-Ter; pCATgfp; KDEL | J. Bautor & R. Lühns, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-10 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; Klonierungsvektor mit <i>Bst</i> XI-MCS | S. Unseld, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-59 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; Klonierungsvektor mit <i>Ascl</i> / <i>PacI</i> -MCS | J. Bautor & R. Lühns, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-89 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; Donorplasmid für PCR-Amplifikation des MAS-Promotors | J. Bautor & R. Lühns, MPB Cologne GmbH |
| pMPB11-5 | pLH9000-Derivat; binärer Vektor mit veränderter MCS; Nos-Terminator; <i>nptII</i> -Gen; Nos-Promotor; Str ^R ; Spec ^R | J. Bautor & R. Lühns, MPB Cologne GmbH |
| pMPB11-7 | pLH9000-Derivat; binärer Vektor mit veränderter MCS; Str ^R ; Spec ^R | J. Bautor & S. Biernacki, diese Arbeit |
| pMPB17-11 | pLH9000-Derivat; Str ^R ; Spec ^R ; binärer Vektor mit GUS-Gen unter Kontrolle des 2x35S TL-Promotor; 35S-Ter; Positivkontrolle für GUS-Pflanzen | A. Berger & L. Bülow, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-19 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor; FatB4-Terminator; FLP-Rekombinase; Expressionsplasmid der FLP-Rekombinase in transienten Protoplasten Tests | S. Unseld, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-4 | pUC-Derivat; Amp ^R ; 2x35S-Promotor; pCATgfp; Sul ^R ; 35S-Ter; zwei Wildtyp <i>FRT</i> sites trennen die GFP-codierende Sequenz vom 35S-Promotor; FRT-Testplasmid für transiente Protoplasten Assays | S. Unseld, MPB Cologne GmbH |
| pMPB7-51 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor; Wildtyp FRT1; FLPe6 mit IV2; Wildtyp Östrogen-Bindungs-Domäne (EBD ₂₅₁); 35S-Ter; Shuttlevektor A (<i>Sfi</i> I-Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-52 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor; Wildtyp FRT1; FLPe6 mit IV2; verkürzte Östrogen-Bindungs-Domäne (EBD ₂₇₇); 35S-Ter; Shuttlevektor A (<i>Sfi</i> I-Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-54 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; 2x35S TL-Promotor; Wildtyp FRT1; FLPe6 mit IV2; Glucocortikoid-Bindungs-Domäne (GBD ₁₇₄₇₁); 35S-Ter; Shuttlevektor A (<i>Sfi</i> I-Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-69 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; GUS-Gen; OCS-Terminator; Shuttlevektor C (<i>Bst</i> XI-Kassette) | diese Arbeit |

| Name | Beschreibung | Referenz |
|----------|--|--------------|
| pMPB7-70 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; NOS-Promotor; <i>npt</i> II-Gen; Thymidin-Kinase (TK); NOS-Terminator; Shuttlevektor B (<i>Ascl</i> / <i>PacI</i> -Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-71 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; NOS-Promotor; NptII-Gen; Cytosin-Desaminase; NOS-Terminator; Shuttlevektor B (<i>Ascl</i> / <i>PacI</i> -Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-73 | pMPB11-7 mit <i>Ascl</i> / <i>PacI</i> -Kassette aus pMPB7-70 und <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-69 (Vorkonstrukt) | diese Arbeit |
| pMPB7-74 | pMPB11-7 mit <i>Ascl</i> / <i>PacI</i> -Kassette aus pMPB7-71 und <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-69 (Vorkonstrukt) | diese Arbeit |
| pMPB7-75 | pMPB7-73 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-51; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-76 | pMPB7-73 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-52; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-77 | pMPB7-73 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-54; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-78 | pMPB7-74 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-51; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-79 | pMPB7-74 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-52; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-80 | pMPB7-74 mit <i>Sfi</i> I-Kassette aus pMPB7-54; Endkonstrukt für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-81 | pBS-Derivat; Amp ^R ; GFP-Kassette aus pMPB5-38 via <i>Nco</i> I/ <i>Nsi</i> I in Plasmid pMPB7-69 | diese Arbeit |
| pMPB7-82 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-75; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-83 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-76; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-84 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-77; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>Nicotiana benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-85 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-78; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-86 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-79; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-87 | <i>Bst</i> XI-Kassette aus pMPB7-81 in Plasmid pMPB7-80; binärer Vektor für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |
| pMPB7-88 | pCATgfp-Kassette aus Plasmid pMPB5-38 via <i>Sfi</i> I in den binären Vektor pMPB11-5; Positivkontrolle für Agroinfiltration von <i>N. benthamiana</i> | diese Arbeit |

| Name | Beschreibung | Referenz |
|-----------|---|--------------|
| pMPB7-93 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; NOS-Promotor, <i>npt</i> II-Gen und g4-Terminator aus pSR8-30; verkürzter MAS-Promotor aus pMPB7-89; Cytosin-Desaminase; NOS-Terminator; Shuttlevektor B (<i>Ascl/PacI</i> -Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-94 | pBSK-Derivat; Amp ^R ; NOS-Promotor, <i>npt</i> II-Gen und g4-Terminator aus pSR8-30; 2' MAS-Promotor aus pMPB7-89; Cytosin-Desaminase; NOS-Terminator; Shuttlevektor B (<i>Ascl/PacI</i> -Kassette) | diese Arbeit |
| pMPB7-98 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus pMPB7-93 in pMPB7-78; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-99 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus pMPB7-93 in pMPB7-79; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-100 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus pMPB7-93 in pMPB7-80; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-101 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus Plasmid pMPB7-94 in Plasmid pMPB7-78; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-102 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus pMPB7-94 in pMPB7-79; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-103 | <i>Ascl/PacI</i> -Kassette aus pMPB7-94 in pMPB7-80; binärer Vektor für Kartoffeltransformation | diese Arbeit |
| pMPB7-105 | Deletion der <i>SfiI</i> -Kassette aus pMPB7-98 (Vorkonstrukt) | diese Arbeit |
| pMPB7-106 | Deletion der <i>SfiI</i> -Kassette aus pMPB7-101 (Vorkonstrukt) | diese Arbeit |

pMPB7-13 bis pMPB7-17 und pMPB7-21 bis pMPB7-36 sind prinzipiell wie pMPB7-4 aufgebaut, enthalten aber veränderte *FRT*sites (S. Unseld, MPB Cologne GmbH). Die *FRT*site-Mutanten sind im Anhang in Tab. 6.1 aufgelistet.

Alle hier klonierten Plasmide wurden mittels Sequenzanalysen, die von einem kommerziellen Anbieter (SequiServe, Vaterstetten) durchgeführt wurden, überprüft.

2.3.4 Bakterienstämme

Tab. 2.6: Verwendete Bakterienstämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|------------------------------|---|------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>supE44; hsdR17; recA1; endA1; gyrA46 thi-1; relA1; lac-F'(proAB⁺lacI^f lacZ M15 Tn10 Tet^R)</i> | Bullock <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>A. tumefaciens</i> EHA101 | Rif ^R ; Km ^R | Hood <i>et al.</i> , 1993 |

2.3.5 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum (L.) var. Samsun NN

Nicotiana benthamiana (L.)

Solanum tuberosum (L.) var. Désirée

2.4 Anzucht von *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *E. coli*- und *A. tumefaciens*-Stämmen erfolgte in LB- oder YEB-Medium. Flüssigkulturen wurden bei 220 Upm und 37°C (*E. coli*) bzw. bei 28°C (*A. tumefaciens*) angezogen. Für das Wachstum unter Selektionsbedingungen wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (s. Tab. 2.4). Allen Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 1.5 % (w/v) zugesetzt.

LB-Medium:

1.0 % (w/v) Bacto-Trypton
0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt
1.0 % (w/v) NaCl
ad pH 7.5 mit NaOH

YEB-Medium:

0.5 % (w/v) Bacto-Trypton
0.1 % (w/v) Hefe-Extrakt
0.5 % (w/v) Pepton
0.5 % (w/v) Saccharose
2 mM MgCl₂
ad pH 7.0 mit NaOH

Tab. 2.7: Antibiotikakonzentrationen für die Selektion von *E. coli* und *A. tumefaciens*

| Antibiotikum | Konzentration (mg/L) | |
|---------------|----------------------|-----------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>A. tumefaciens</i> |
| Ampicillin | 100 | - |
| Kanamycin | 25 | 25 |
| Spectinomycin | 100 | 100 |
| Streptomycin | 25 | 25 |
| Tetrazyklin | 12.5 | - |
| Rifampicin | - | 100 |

2.5 Molekularbiologische Standardmethoden

2.5.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* und *A. tumefaciens*

Die Isolierung von hochreiner Plasmid-DNA aus Bakterien basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) und wurde mit dem Concert™ Rapid Miniprep System von Life Technologies nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Isolierung von Plasmiden aus *A. tumefaciens* wurden die sedimentierten Zellen in 400 µl Resuspensionslösung aufgenommen und die Volumina der nachfolgenden Lösungen entsprechend angepasst. Nach einem zusätzlichen Waschschrift erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 100 µl 65°C warmem *A. bidest.* Die anschließende Fällung der DNA wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.5.2 Plasmid-Schnellisolierung aus *E. coli* („Boiling-Triton“ Methode)

Zur schnellen Präparation von Plasmiden wurden 1.5 ml einer üN-Kultur für 1 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 150 µl STEL-Puffer resuspendiert, 30 s bei 99°C erhitzt und für 20 min und 13000 Upm bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit einem sterilem Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt, 180 µl Isopropanol hinzu pipettiert, der Ansatz für 5 s gevortext und erneut 5 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet

mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde in 50 µl *A. bidest* aufgenommen.

STEL-Puffer:

| | |
|-----------|---|
| 8 % (w/v) | Saccharose |
| 5 % (w/v) | Triton X-100 |
| 50 mM | Tris-HCl, pH 8.0 |
| 50 mM | EDTA |
| 0.5 mg/ml | Lysozym (vor Gebrauch frisch zum STEL-Puffer hinzufügen.) |

2.5.3 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach dem von Sambrook *et al.* (1989) publizierten Standardprotokoll in 1 % (w/v) Agarosegelen und wurden vor dem Auftragen mit einem entsprechendem Volumen 6-fach konzentriertem Gelladepuffer versetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

6xGelladepuffer:

| | |
|--------------------|------------|
| 40 % (w/v) | Saccharose |
| 0.5 % (w/v) | Orange G |
| in TE-Puffer lösen | |

10xTBE-Puffer:

| | |
|--------|------------------|
| 1 M | Tris-HCl, pH 8.3 |
| 0.9 M | Na-Borat |
| 0.01 M | EDTA |

TE-Puffer:

| | |
|-------|------------------|
| 1 mM | EDTA |
| 20 mM | Tris-HCl, pH 7.5 |

2.5.4 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In eine Standard-PCR wurden 1-100 ng der zu amplifizierenden DNA, je 100 pmol der beiden Oligonukleotide, 2 µl eines 2 mM dNTP-Gemisches, 5 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂ und 0.3 µl *Taq*-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl in einem 0.5 ml Eppendorfgefäß zusammengegeben. Folgende Temperaturzyklen wurden für eine Standard-Amplifikation gewählt: (3 min-94°C), 30-35 Zyklen (1 min-94°C / 1 min-x°C / 1 min-72°C), (3 min-72°C). Die Annealingtemperatur (x°C) wurde je nach Schmelztemperatur der Primer variiert.

2.5.6 Ortsgerichtete *in vitro* Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mittels des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Europe Ltd., Amsterdam, NL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.7 Elektroporation von Bakterien

Die Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt. 1-10 µl Plasmid-DNA wurden in die Küvetten überführt und anschließend die auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen hinzugefügt. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Parametern: „Gene-Pulser“: 25 mF, 2.5 kV; „Pulse Controller“: 200 Ω; Küvette: 0.2 cm Abstand der Elektrodenkontakte.

Nach erfolgter Transformation wurde direkt 400 µl LB-Medium (*E. coli*) bzw. 800 µl YEB-Medium (*A. tumefaciens*) in die Küvette pipettiert, die Bakterien-suspension anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30-60 min bei 37°C und 220 Upm im Schüttler inkubiert. Für *A. tumefaciens* erfolgte die Inkubation 2 h bei 28°C. Die Bakterien wurden in entsprechenden Aliquots auf Selektionsplatten ausplattiert und üN bei 37°C bzw. 24-48 h bei 28°C inkubiert.

Alle hier nicht aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach den von Sambrook *et al.* (1989) publizierten Protokollen durchgeführt.

2.6 Biochemische Standardmethoden

2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *N. benthamiana*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *N. benthamiana* wurden 0.1-0.4 g Blattmaterial in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 1 Vol Extraktionspuffer versetzt und homogenisiert. Die lösliche Proteinfraction wurde durch Zentrifugation (2x 10 min, 13000 Upm, 4°C) gewonnen, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zum Gebrauch auf Eis gelagert oder bei -80°C verwahrt. Für die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung wurde eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt.

GUS-Extraktionspuffer:

50 mM Na-Phosphatpuffer
10 mM EDTA
10 mM DTT
0.1 % (w/v) Triton X-100
0.1 % (w/v) Na-Laurylsarcosin

GFP-Extraktionspuffer:

20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7.0
1 mM Natriumbisulfit

2.6.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test (Bradford, 1976) mit BSA als Proteinstandard im Bereich von 0.2-1 mg/ml Protein bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-Photometer durchgeführt. Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in kommerziell erhältlichen 12 %igen Bis-Tris-Gelen (Invitrogen). Die Proben wurden mit einem entsprechenden Volumen Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 99°C denaturiert. Pro Spur wurden 30 bis 45µg Gesamtprotein geladen. Als Molekulargewichtsstandard diente der SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Marker (Invitrogen). Die Elektrophorese wurde mit MOPS-Puffer als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 200 V durchgeführt.

Ladepuffer:

6 ml Glycerin
 0.45 g Tris
 1.2 g SDS
 0.15 g DTT
 1-2 Krümel Bromphenolblau
 mit A. bidest auf 10 ml auffüllen
 ad pH 6.6 mit HCl einstellen

20xMOPS-Puffer:

1 M MOPS
 1 M Tris
 69.3 mM SDS
 20.5 mM EDTA

2.6.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose („Western-Blot“)

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose erfolgte im „Semi-dry“-Verfahren. Vor dem Blotaufbau wurde das Gel, die Membran und das Whatman-Papier 10 min in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte bei 50 mA (0.8 mA/cm² Membran) für 45 min.

Transferpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8.3
 192 mM Glycinsäure
 10 % (v/v) Ethanol

2.6.5 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine

Zum immunologischen Nachweis der im Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose wurden zunächst unbesetzte Bindestellen der Membran mit Blocking-Puffer für 1 h bei RT oder üN bei 4°C abgesättigt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in TBS-Puffer mit 1 % (w/v) Tween und 0.2 % (w/v) I-Block (Tropix) bei RT für 2 h inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBST-Puffer (je 5 min) entfernt. Danach wurde die Membran 1 h mit dem sekundären Antikörper in TBS-Puffer mit 0.15 % (w/v) Tween und 0.2 % (w/v) I-Block bei RT inkubiert. Der überschüssige sekundäre Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit TBST-Puffer entfernt. Im Anschluss wurde die Membran 2x 5 min mit AP-Puffer equilibriert. Der Nachweis erfolgte in AP-Puffer mit 75 mg/ml p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP). Die Farbreaktion wurde nach 5-30 min mit H₂O gestoppt.

TBS[T]-Puffer:

| | |
|---------------|-----------------|
| 10 mM | Tris/HCl pH 8.5 |
| 150 mM | NaCl |
| [0.05 % (w/v) | Tween 20] |

AP-Puffer:

| | |
|--------|-------------------|
| 100 mM | Tris/HCl pH 9.5 |
| 100 mM | NaCl |
| 50 mM | MgCl ₂ |

Tab. 2.8: Liste der verwendeten Antikörperkombinationen

| 1.AK/Verdünnung | 2.AK/Verdünnung |
|--|-------------------------------|
| Maus-anti-GFP (monoklonal)/1:500 | AP-Ratte-anti-Maus IgG/1:1000 |
| Kaninchen-anti-GUS (polyklonal)/1:1000 | AP-anti-Kaninchen IgG/1:2000 |

2.7 Präparation von genomischer DNA aus Kartoffelblättern

Die Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen wurde nach Angaben des Herstellers mit dem DNeasy™ Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Pro Ansatz wurden etwa vier bis fünf Kartoffelblätter aus Sterilkultur geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert.

2.8 Nachweis von β -Glucuronidaseaktivität in transgenen Pflanzen**2.8.1 Histochemische Detektion der β -Glucuronidaseaktivität**

Die histochemische Detektion der GUS-Aktivität in pflanzlichen Geweben erfolgte über die Umsetzung des farblosen Substrates X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoylglucoronid) in ein blau gefärbtes Produkt durch die β -Glucuronidase (GUS). Das transgene Pflanzenmaterial wurden in kleine Petrischalen (\varnothing 3 cm bzw. 5 cm) überführt und die GUS-Färbelösung hinzugefügt. Mit Hilfe eines Exsikkators wurden die Pflanzen vakuuminfiltiert, bis Luftbläschen aus dem Gewebe austraten. Es erfolgte eine Inkubation üN bei 37°C, bis eine Blaufärbung sichtbar wurde. Im Anschluss daran wurde das Chlorophyll aus dem Gewebe durch EtOH extrahiert und der Farbstoff fixiert. In einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden folgende Inkubationsschritte gewählt: 30 min in 30 % (v/v) Ethanol (EtOH), 1 h in 70 % (v/v)

EtOH, bis zur kompletten Entfärbung in 100 % (v/v) EtOH. Zur Aufbewahrung wurde das Gewebe bei RT in 100 % (v/v) EtOH gelagert.

GUS-Färbelösung:

50 mM NaPO₄, pH 7.0
1 mM X-Gluc, gelöst in DMSO
1 mM EDTA
0.05 % (w/v) Triton X-100

2.8.2 Messung von β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzenextrakten

Die quantitative Bestimmung von β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzenextrakten erfolgt anhand der Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4MUG) zu 4-Methylumbelliferon (4MU). Die zeitabhängige Produktzunahme wurde im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emission bei 460 nm gemessen.

Zur fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung wurden 95 μ l des Extraktionspuffers (vgl. Kap. 2.6.1) mit 5 μ l Proteinextrakt (Extrakt wurde auf 1 μ g/ μ l Protein eingestellt) in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 100 μ l Substratlösung (37°C) hinzu pipettiert und die Messwerte im Fluorimeter in fünfminütigem Abstand eine Stunde lang gemessen. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Substratlösung:

GUS-Extraktionspuffer
+ 2 mM 4MUG

2.9 Transiente Transformation von Protoplasten aus *N. tabacum*

2.9.1 Anzucht von *N. tabacum* var. Samsun NN

Vor der Oberflächensterilisation wurden die Samenkörner für 2 min mit 70 % (v/v) Ethanol vorbehandelt, um für den Sterilisationsprozess eine bessere Benetzbarkeit der Samenoberfläche zu erzeugen. Die anschließende Sterilisation erfolgte durch 5 min Inkubation in 5 % (v/v) Natriumhypochlorid. Durch fünf- bis zehnmaliges Waschen wurde das Hypochlorid mit sterilem *A. bidest* vollständig entfernt. Auf sterilen Petrischalen mit 2MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962) wurden pro Platte ca. 50-100 Samen gleichmäßig verteilt. Die Pflanzen wurden bei einer täglichen Lichtperiode von 9 h mit ca. $60 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ und einer Durchschnittstemperatur von 23°C in einer Phytokammer angezogen. Die Vermehrung älterer Tabakpflanzen erfolgte anhand von Stecklingen ebenfalls auf 2MS-Medium.

2MS-Medium:

für 1 Liter:

| | | |
|---------------------------|-----|---|
| M&S-Salze | 4.3 | g |
| MES | 0.5 | g |
| Agar | 8 | g |
| Saccharose | 20 | g |
| ad pH von 5.7-5.8 mit KOH | | |

2.9.2 Herstellung und Isolierung der Protoplasten

Von steril angezogenen Tabakpflanzen (3-4 Wochen alt) wurden ca. 8 Blätter geerntet und in eine Petrischale mit 12 ml Enzymlösung überführt. Die Blätter wurden von der Mittelrippe ausgehend in dünne Streifen geschnitten und üN bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Petrischale 30 min langsam geschüttelt, so dass sich die Protoplasten vom Gewebe trennen konnten.

Zur Isolierung der Protoplasten wurde die Suspension mit einer weithalsigen 10 ml Glaspipette durch eine Stahlsiebkombination (oberes Sieb: Porengröße 250 μM , unteres Sieb: Porengröße 100 μM) filtriert und 2x mit 12 ml W5-Medium gewaschen. Anschließend wurde die Suspension in Reagenzgläser mit Schraubdeckeln überführt und 5 min bei 60x g und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen, das viskose Pellet mit einer Pasteurpipette auf 5 ml CPW20S-Medium geschichtet und nochmals für 10 min bei 60x g und 10°C zentrifugiert.

Die intakten Protoplasten wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein frisches Reagenzglas überführt und 8 ml W5-Medium hinzu pipettiert. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Brand) wurde die Anzahl der Protoplasten bestimmt, bevor erneut eine Zentrifugation für 5 min bei 60x g und 10°C durchgeführt wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in MaMg-Lösung zu einer Endkonzentration von 1×10^6 Protoplasten/ml aufgenommen.

W5-Medium:

125 mM CaCl_2
100 mM NaCl
10 mM KCl
2.5 mM MES
pH 5.6–5.8, 550 mOs

CPW-Medium:

10 mM CaCl_2
0.2 mM KH_2PO_4
1 mM KNO_3
1 mM MgSO_4
1.3 mM MES
pH 5.6–5.8

Enzymlösung:

1 % (w/v) Cellulase
0.3 % (w/v) Macerozym
in CPWM-Medium

CPWM-Medium:

8.4 g Mannit
ad 100 ml CPW-Medium
550 mOs

CPW20S-Medium:

20 g Saccharose
ad 100 ml CPW-Medium
810 mOs

MaMg-Lösung:

0.3 M Mannit
0.1 M MgCl_2
0.01 M MES
pH 5.6, 550–600 mOs

2.9.3 Transformation der Protoplasten mittels PEG

Für jedes Konstrukt wurden 20 µg DNA in eine Petrischale (Ø 5 cm) überführt, 300 µl Protoplastensuspension hinzupipettiert und 5 min bei RT inkubiert. 600 µl PEG-Lösung wurden in 125 µl-Tropfen zur Protoplastensuspension hinzugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde in 500 µl-Schritten die PEG-Lösung mit Kao-Medium verdünnt, wobei zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten jeweils 5 min gewartet wurde. Die Protoplasten wurden ün

im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte an den darauf folgenden zwei Tagen im Fluoreszenzmikroskop.

Kao-Medium:

| | |
|---------------------|---------------------------|
| 3.7 g | Kao-Salzmischung |
| 1 ml | Kao-Vitamin-Lösung (100x) |
| 500 mg | myo-Inositol |
| 60 g | Glucose |
| 1 mg | 2.4-D |
| 0.1 mg | NAA |
| 0.1 mg | BAP |
| pH 5.6-5.8, 550 mOs | |

PEG-Lösung:

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| 0.4 M | Mannit |
| 0.1 M | Ca(NO ₃) ₂ |
| 0.1 % (w/v) | MES |
| pH ≥ 7 | |
| 400 g/l | PEG 6000 |

2.10 Transiente Transformation von *N. benthamiana* mittels Infiltration von *A. tumefaciens*

2.10.1 Anzucht von *N. benthamiana* (L.)

N. benthamiana-Samen wurden in Anzuchtschalen oder 6er-Töpfen ausgesät und unter einer Plastikhaube im Gewächshaus bei mindestens 16°C angezogen. Zwei Wochen nach Aussaat wurden die Pflänzchen in 7 cm-Töpfen pikiert. Etwa 10 Tage nach Vereinzelung konnten die Pflanzen zur Agroinfiltration verwendet werden.

2.10.2 Anzucht von *A. tumefaciens*

Zwei Tage vor der Infiltration wurden die zu testenden Agrobakterien in 5 ml L-broth-Medium mit den entsprechenden Antibiotikakonzentrationen üN bei 28°C angezogen. 1 ml der üN-Kultur wurde in 50 ml L-broth-Medium mit 10 mM MES und 20 µM Acetosyringon überimpft und erneut üN bei 28°C inkubiert.

Am Tage der Infiltration wurden die Zellen durch Zentrifugation (45 min, 4000 Upm, 10°C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml Infiltrationslösung resuspendiert und für 3 h bei RT inkubiert.

L-broth-Medium:

| | |
|-------------|-------------|
| 1 % (w/v) | Trypton |
| 0.5 % (w/v) | Hefeextrakt |
| 0.5 % (w/v) | NaCl |
| pH 7.4 | |

Infiltrationslösung:

| | |
|--------|-------------------|
| 10 mM | MgCl ₂ |
| 10 mM | MES |
| 100 µM | Acetosyringon |

2.10.3 Infiltration der *N. benthamiana*- Blätter

Die Infiltration der Agrobakterien erfolgte *in planta*, d.h. die Blätter verblieben an der Pflanze. Die Blätter von 3-4 Wochen alten Pflanzen wurden an der Unterseite mit einer Rasierklinge leicht angeritzt. Etwa 1 ml der Agrobakterienlösung wurde in einer 2 ml-Spritze (ohne Nadel) aufgezogen, die Spritze mit der Kanüle auf die angeritzte Stelle aufgesetzt und soviel Lösung in die Blattspreite gespritzt, bis die gesamte Fläche infiltriert war. Die Inkubation der Pflanzen erfolgte bei 22°C im Pflanzenkulturschrank. Nach 5 Tagen wurden die Blätter geerntet und analysiert.

2.11 Transformation von *Solanum tuberosum* mittels *A. tumefaciens*

Die sterile Anzucht von zur Transformation bestimmten Kartoffelpflanzen sowie bereits transformierter Pflanzen erfolgte über Stecklinge auf 2MS-Medium bei einer täglichen Lichtperiode von 9 h mit ca. 60 µE s⁻¹m⁻² und einer Durchschnittstemperatur von 23°C in einer Phytokammer.

Zur Transformation wurden etwa vier Wochen alte Kartoffelblätter aus Gewebekultur geerntet, die Mittelrippen entfernt und die Blattoberseiten mit der Rasierklinge leicht überstrichen. Die so behandelten Blätter wurden mit der Blattoberseite nach unten in eine mit 20 ml MS-Medium gefüllte Petrischale überführt. Nach Zugabe von 50 µl einer Agrobakterienkultur wurden die Schalen 2 min vorsichtig geschüttelt und anschließend zwei Tage im Dunkeln bei RT inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Blätter auf sterilem Filterpapier kurz abgetupft und zur Induktion der Kallusbildung mit der Blattoberseite nach unten auf Kallusinduktionsmedium (CIM) überführt. Nach einer Woche wurden die Blätter zur Sprossinduktion auf Sprossinduktionsmedium (SIM) transferiert. Im Abstand

von 7-14 Tagen wurden die Blätter auf frisches Medium überführt. Sich entwickelnde Sprosse wurden bei einer Länge von etwa 2 cm vom Kallus entfernt und zum Bewurzeln auf 2CK-Medium gesetzt. Transgene Pflanzen wurden kontinuierlich auf 2CK-Medium gehalten.

1.6 MS-Medium:

4.4 g MS-Salze
1 g MES
16 g Saccharose
ad 1000 ml *A. bidest*, pH 7.5

CIM-Medium:

5 mg/l NAA
0.1 mg/l BAP
500 mg/l Cefotaxim
50 mg/l Kanamycin
in 1.6 MS-Medium

SIM-Medium:

20 µg/l NAA
20 µg/l GA₃
250 mg/l Cefotaxim
50 mg/l Kanamycin
2 mg/l Zeatinribosid
in 1.6 MS-Medium

2CK-Medium:

250 mg/l Cefotaxim
50 mg/l Kanamycin
in 2MS-Medium mit Agar

2.12 Bildbearbeitung

Bei den Fotografien in dieser Arbeit handelt es sich ausschließlich um digitale Videobilder.

3. Ergebnisse

3.1 Vektorkonstrukte für die stabile Transformation

Folgende Parameter determinierten die Klonierungsstrategie: [a] Alle DNA-Sequenzen, die nach der Selektion nicht mehr benötigt werden, müssen zwischen den beiden *FRT*sites liegen, so dass sie in einem Schritt aus dem Genom entfernt werden können. [b] Das Fremdgen („gene of interest“ oder GOI) sollte in einfachen Klonierungsschritten durch ein anderes GOI ersetzt werden können. [c] Die Expressionskassetten sollten keine identischen Promotoren und Terminationssignale enthalten, um „gene silencing“ zu verhindern. [d] Die T-DNA sollte ein Negativ-Selektionssystem enthalten.

Die Hauptkomponenten (FLP, Negativ-Selektionsgen und Fremdgen) wurden zunächst in drei verschiedene Expressionskassetten kloniert. Jede dieser Kassetten wurde in einem Vektor konstruiert, der sich von den anderen beiden hinsichtlich der flankierenden Restriktionsschnittstellen unterschied. In Abbildung 3.1 ist das Vektorsystem illustriert.

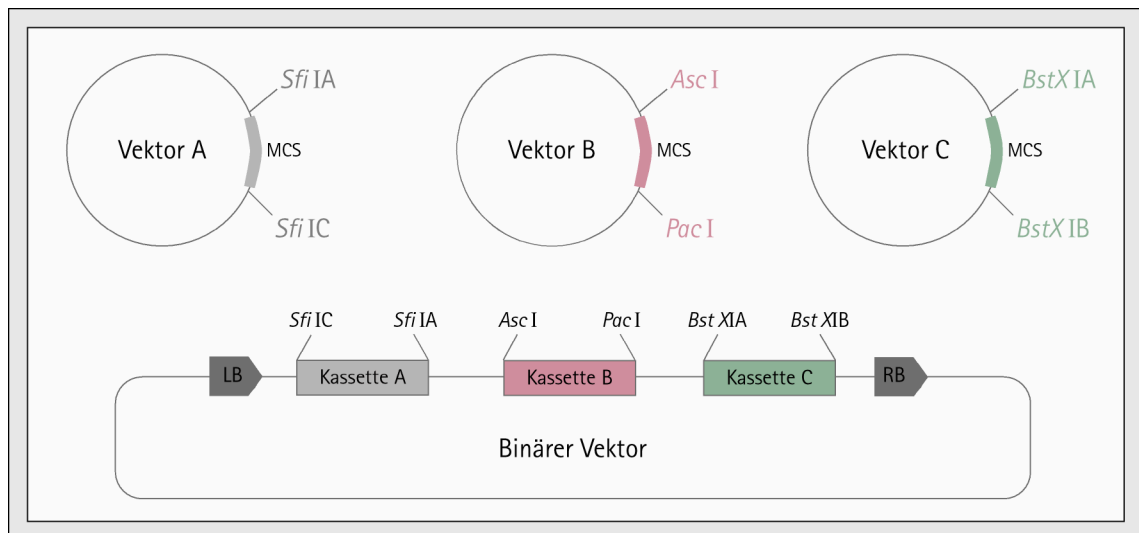


Abb. 3.1 Schematische Darstellung des Vektorsystems. Bei den Klonierungsvektoren handelt es sich um pBSK-Derivate mit modifizierten MCS, die jeweils von zwei spezifischen Restriktionsschnittstellen flankiert sind. Über diese Schnittstellen können die Kassetten in den binären Vektor eingebracht werden. pBSK: pBluescript SK; MCS: Multiple Klonierungsstelle.

In Abbildung 3.2 ist der Aufbau des binären Vektors schematisch dargestellt: Das Fremdgen (*GOI*) ist vom zugehörigen Promotor durch die Rekombinase und das Positiv/Negativ-Selektionssystem räumlich getrennt, so dass erst nach erfolgter Rekombination und Deletion der zwischen den beiden *FRT*sites liegenden DNA-

Sequenzen eine Expression des Fremdgens stattfinden kann. In den folgenden Kapiteln werden die Subklonierungen A, B und C zur Herstellung der einzelnen Kassetten erläutert.

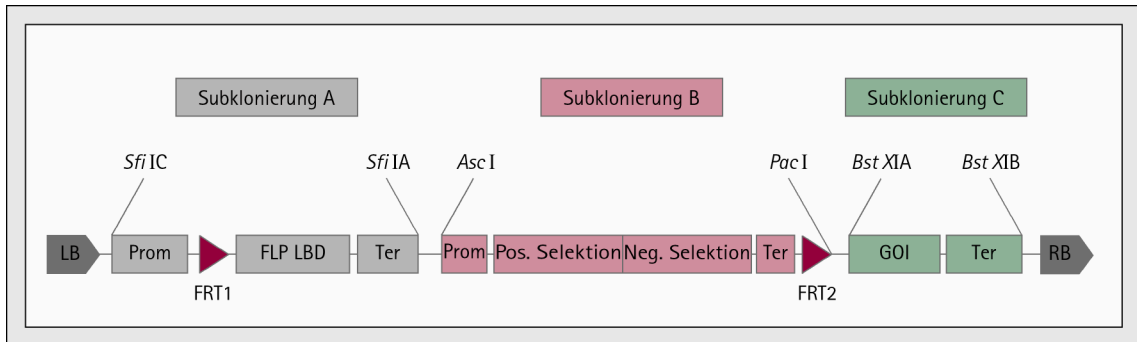


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der T-DNA des binären Vektors. Die Klonierung der einzelnen Kassetten wurde in verschiedenen Klonierungsvektoren durchgeführt, in denen die jeweiligen MCS von spezifischen Restriktionsschnittstellen flankiert waren. LB/RB: linke/rechte Border; Prom: Promotor; FRT: Spezifische Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase; FLP LBD: Fusionsgen der FLP-Rekombinase mit der Liganden-Bindungs-Domäne eines Steroidrezeptors; Ter: Terminator; GOI: „gene of interest“.

3.1.1 Subklonierung A (Kassette mit Promotor, FLP LBD, Terminator)

Die FLP-Rekombinase wurde mit den Liganden-bindenden Domänen (LBD) zweier unterschiedlicher Steroidrezeptoren fusioniert, um zu testen, welche zur Regulation der Rekombinase-Aktivität im Kartoffelsystem am besten geeignet ist. Es wurden die Wildtyp-LBD des humanen Östrogenrezeptors (EBD₂₅₁), eine verkürzte Variation des humanen Östrogenrezeptors (EBD₂₇₇) und die LBD des humanen Glucocortikoidrezeptors (GBD) getestet (Abb. 3.3).

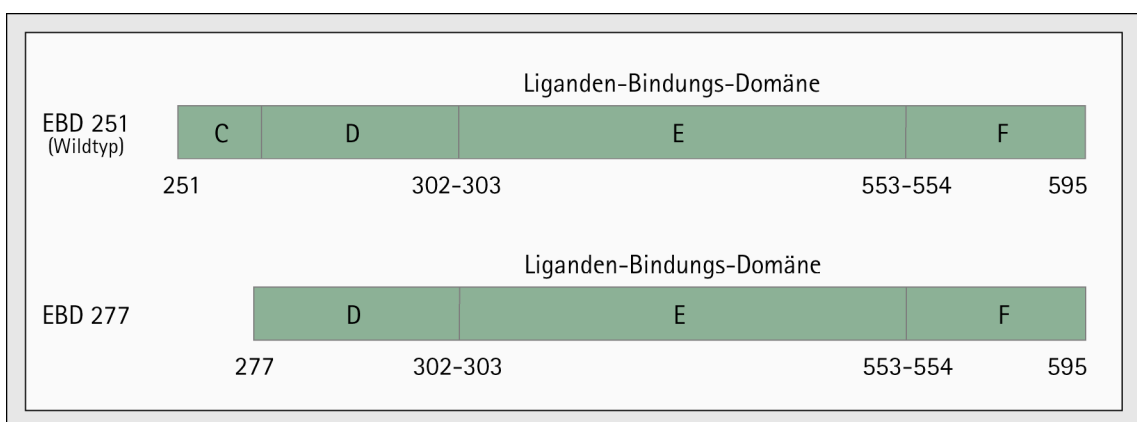


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des Östrogenrezeptors. EBD₂₅₁ entspricht dem Wildtyp-Steroidrezeptor, bei der EBD₂₇₇ wurden die ersten 26 Aminosäuren deletiert. Die Zahlen geben die entsprechenden Aminosäuren im Protein an.

Bei der hier verwendeten FLP handelt es sich um eine modifizierte Rekombinase, die gegenüber der Wildtyp-FLP eine höhere Thermostabilität aufweist (Buchholz *et al.*, 1998). Zudem wurde in die kodierende Region der FLP das Intron IV2 aus dem Kartoffelgen ST-LS1 inseriert (Vancanneyt *et al.*, 1990), um eine Aktivität der Rekombinase in prokaryotischen Zellen zu verhindern.

Ausgangsvektor für die Subklonierung A war der Vektor pMPB1-28 (s. Kap. 2.3.3), bei dem der 2xCaMV35S-Promotor mit Translations-Verstärker, die MCS und der 35S-Terminator von zwei *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen flankiert werden (Abb. 3.4 [a]). Mit Hilfe der Linker *FRT1NcoI* und *FRT1SalI* (s. Kap. 2.3.2) wurde die Wildtyp *FRT1* in den Vektor ligiert. Über *SalI/SacI* wurden die Fusionsgene FLP-EBD₂₅₁ (resultierender Vektor: pMPB7-51) bzw. FLP-EBD₂₇₇ (resultierender Vektor: pMPB7-52) hinzugefügt.

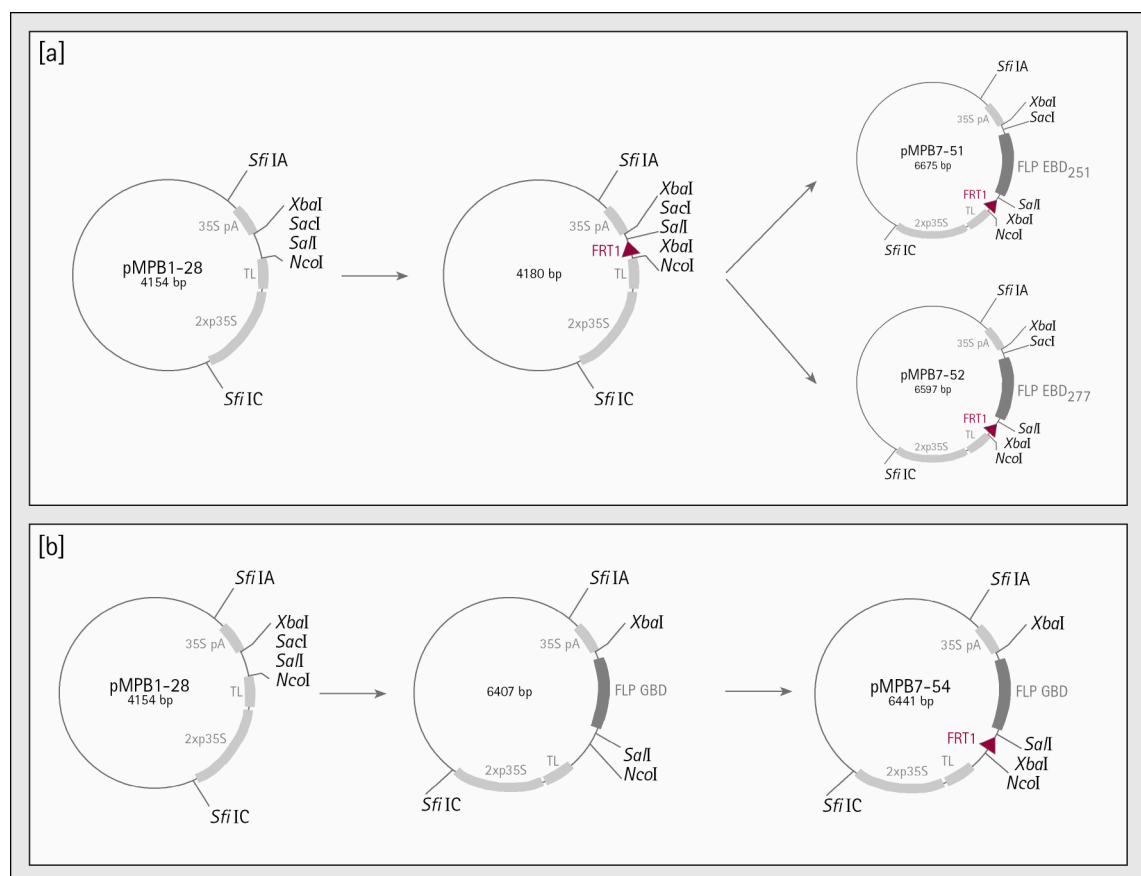


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für Subklonierung A. [a] Klonierung der Fusionsgene FLP EBD₂₅₁ und FLP EBD₂₇₇ und der *FRT1* in den Vektor pMPB1-28. [b] Klonierung des Fusionsgens FLP GBD1747T und der *FRT1* in den Vektor pMPB1-28. Die drei entstandenen Kassetten können über die *Sfi*I-Schnittstelle in den binären Vektor kloniert werden. EBD: Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne; GBD: Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne. 2xp35S: 2x 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus; TL: Translations-Verstärker; 35SpA: 35S-Terminator aus dem Blumenkohl Mosaik Virus.

Für die Klonierung des Fusionsgens FLP-GBD musste eine alternative Klonierungsstrategie gewählt werden, da sich innerhalb der *FRT*site eine *Xba*I-Schnittstelle befindet, das Fusionsgen jedoch nur über *Sall/Xba*I in den Vektor pMPB1-28 kloniert werden konnte. FLP-GBD wurde mittels *Sall/Xba*I in den Vektor pMPB1-28 kloniert (Abb. 3.4 [b]). Anschließend wurde durch die oben aufgeführten Linker die *FRT*1 in den Vektor eingebracht (resultierender Vektor: pMPB7-54).

3.1.2 Subklonierung B (Positiv/Negativ-Selektionssystem)

Zur Negativ-Selektion wurden zwei unterschiedliche Systeme eingesetzt, zum einen die Thymidin-Kinase aus dem *Herpes simplex*-Virus, zum anderen die Cytosin-Desaminase aus *E. coli*. Ausgangsvektor für die Subklonierung B war der Vektor pMPB7-59 (s. Kap. 2.3.3). Es handelte sich um ein pBSK-Derivat mit einer modifizierten MCS, die von den Restriktionsschnittstellen *Asc*I und *Pac*I flankiert wurde, worüber die Kassette anschließend in den binären Vektor eingebracht werden konnte (Abb. 3.5). Die gesamte Kassette wurde über PCR amplifiziert und die Primer dabei so gewählt, dass die benötigten Restriktionsschnittstellen mit eingefügt wurden (s. Kap. 2.3.2).

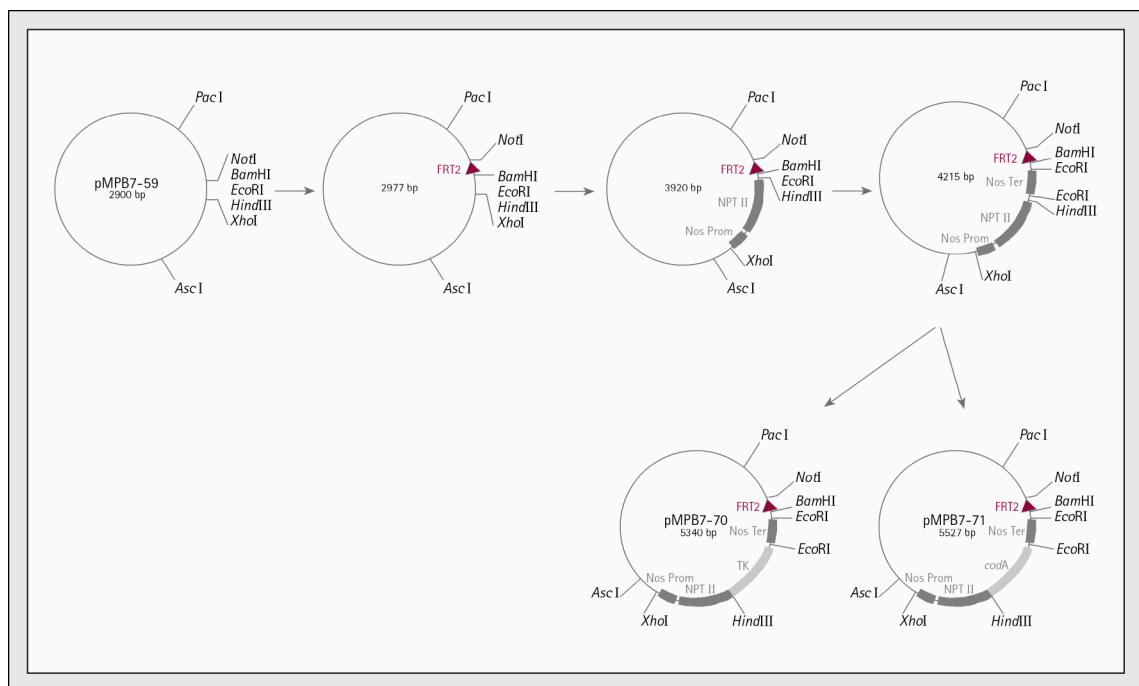


Abb.3.5 Schematische Darstellung der Klonierungsschritte für Subklonierung B. Die einzelnen Gene wurden mittels PCR amplifiziert und nacheinander in den Ausgangsvektor pMPB7-59 kloniert. Die beiden entstandenen Kassetten konnten *via Asc*I/*Pac*I in den binären Vektor kloniert werden. Nos Prom/Nos Ter: Promotor/Terminator der Nopalin-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *nptII*: Kanamycin-Resistenzgen; TK: Thymidin-Kinase-Gen; *codA*: Cytosin-Desaminase-Gen.

Als Matrizen-DNA für das Thymidin-Kinase-Gen wurde das Plasmid pKO SelektTK von Stratagene verwendet (s. Kap. 2.3.3), das Cytosin-Desaminase-Gen wurde aus genomischer DNA von *E. coli* isoliert. Als Positiv-Selektionsmarker diente das Neomycin-Phosphotransferase-Gen (*npt II*) des Transposons Tn5 aus *E. coli*. Dieses sollte C-terminal mit dem jeweiligen Negativ-Selektionsgen fusioniert werden, so dass auch in dieser Kassette nur ein Promotor eingesetzt werden musste. Verwendet wurden der Promotor und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens vom Ti-Plasmid aus *A. tumefaciens*. Die einzelnen Elemente wurden nacheinander in den Ausgangsvektor kloniert, wodurch die Vektoren pMPB7-70 und pMPB7-71 entstanden (Abb. 3.5).

3.1.3 Subklonierung C (Fremdgen & Terminator)

Die dritte Kassette enthält das Fremdgen (GOI). Im Rahmen dieser Arbeit war das Ziel eine erfolgte Rekombination durch die Expression der β -Glucuronidase als Reportergen (Jefferson *et al.*, 1987) nachzuweisen. Das GUS-Gen und ein 212 bp-Fragment der Terminationssequenz des Octopin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens* wurde aus dem Vektor pUK403 (s. Kap. 2.3.3) mittels PCR amplifiziert. Via *KpnI/NsiI* wurde das amplifizierte Fragment in den Ausgangsvektor pMPB7-10 kloniert (resultierender Vektor: pMPB7-69) und anschließend über die *BstXI*-Schnittstellen in den binären Vektor transferiert (s. Abb. 3.6).

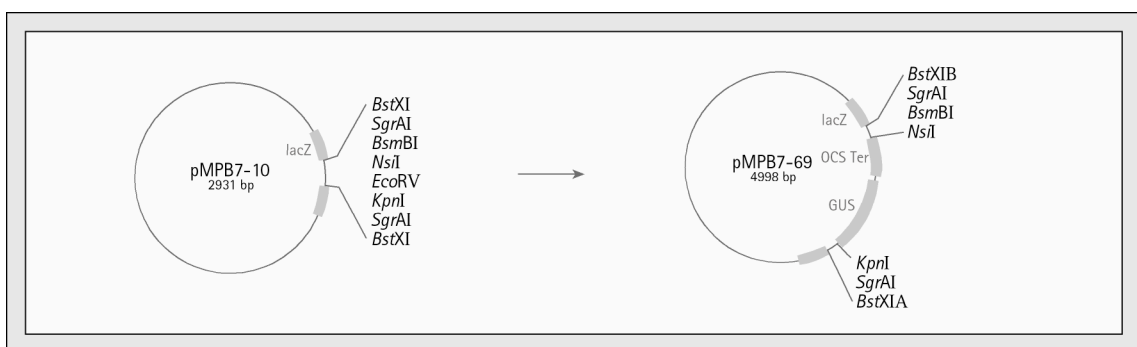


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für Subklonierung C. Das GUS-Gen mit OCS-Terminationssignal wurde aus dem Vektor pUK403 mittels PCR amplifiziert und über *KpnI/NsiI* in den Ausgangsvektor pMPB7-10 kloniert. Die Kassette kann über die *BstXI*-Schnittstellen in den binären Vektoren transferiert werden. lacZ: Gen der β -Galactosidase aus *E. coli*; GUS: Gen der β -Glucuronidase aus *E. coli*; OCS-Ter: Terminator der Octopin-Synthase aus *A. tumefaciens*.

3.1.4 Herstellung der binären Vektoren

Die unter den Subklonierungen A, B und C beschriebenen Kassetten wurden nacheinander in den binären Vektor pMPB11-7 (s. Kap. 2.3.3) kloniert. Dabei handelte es sich um ein pLH9000-Derivat (Hausmann und Töpfer, 1999) mit einer modifizierten MCS. Da alle Endkonstrukte das GUS-Gen enthielten, wurde diese Kassette als erste über die *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pMPB7-69 in den Ausgangsvektor transferiert. Anschließend wurden die zwei unterschiedlichen Negativ-Selektionssysteme *via* *Asc*I/*Pac*I hinzugefügt und zum Schluss die drei verschiedenen Kassetten mit den FLP-LBD Fusionsproteinen über die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen. Die sechs resultierenden binären Vektoren und die zwei Vorkonstrukte sind in der Abbildung 3.7 dargestellt.

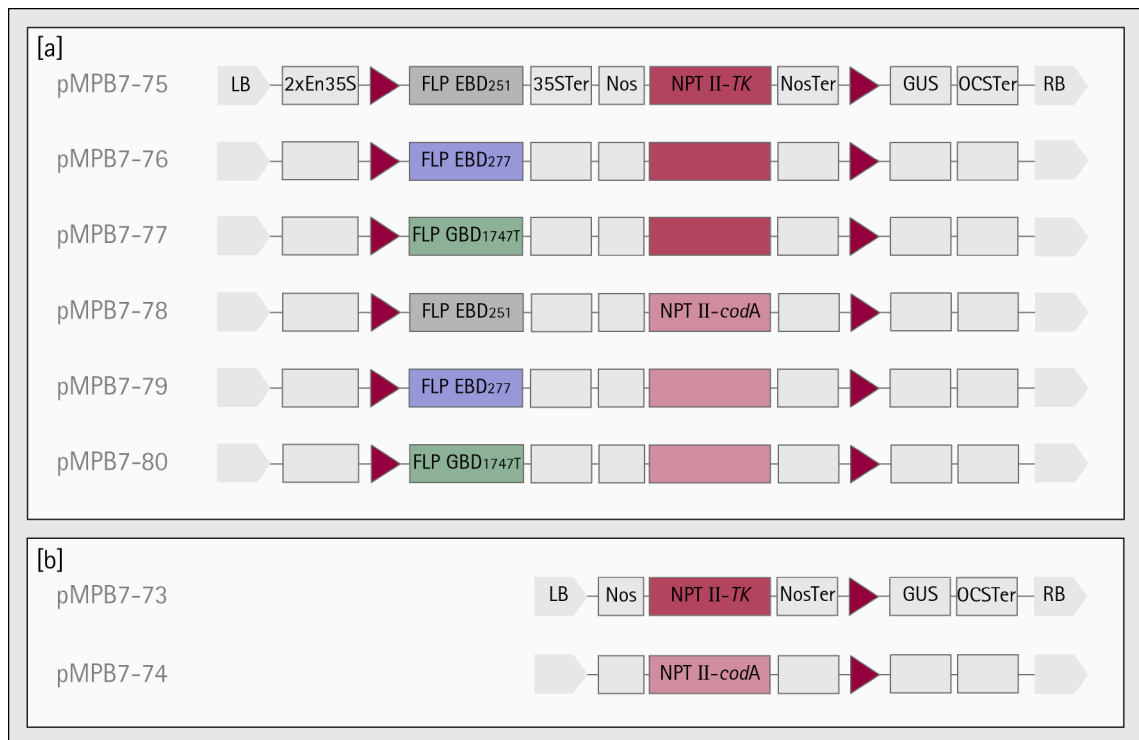


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der T-DNA der binären Vektoren. Durch die Kombination der verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen und der zwei Negativ-Selektionssysteme sind insgesamt sechs Endkonstrukte zur Transformation in die Kartoffel entstanden. Die unterschiedlichen Kassetten wurden in der Reihenfolge C, B und A in die binären Vektoren kloniert. [a] Binäre Endkonstrukte; [b] Vorkonstrukte. LB/RB: linke/rechte Border; EBD: Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne; GBD: Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne; 2x35S: 2x 35S-Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus; 35SpA: 35S-Terminator aus dem Blumenkohl Mosaik Virus; Nos Prom/Nos Ter: Promotor/Terminator der Nopalins-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *nptII*: Kanamycin-Resistenzgen; TK: Thymidin-Kinase-Gen; *codA*: Cytosin-Desaminase-Gen; GUS: Gen der β -Glucuronidase aus *E. coli*; OCS-Ter: Terminator der Octopins-Synthase aus *A. tumefaciens*.

3.2 Funktionalität der *npt II*-Fusionsproteine

Die Transformation von Kartoffel mit den sechs Konstrukten pMPB7-75 bis pMPB7-80 wurde, wie in Kapitel 2.10 beschrieben durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass die verwendeten NPT II-Fusionsproteine aktiv waren, wurde die Regenerationsfähigkeit transformierter Kalli in einer Km-Konzentrationsreihe getestet (50, 25, 12.5 mg/ml). Die Vorkonstrukte pMPB7-73 und pMPB7-74, die nur die *npt II*- und GUS-Kassette enthielten, sowie ein beliebiges weiteres Konstrukt als positive Kontrolle (pMPB7-78) wurden auf Medien mit den unterschiedlichen Kanamycin-Konzentrationen und ohne Kanamycin regeneriert. Als weitere Positivkontrolle wurde ein Plasmid, das bereits erfolgreich in Kartoffel eingebracht wurde, transformiert. Sollte durch die Fusion ein Aktivitätsverlust des *npt II*-Gens aufgetreten sein, dürften Blätter auf Medien mit normalerweise verwendeten Kanamycin-Konzentrationen (50 mg/ml) nicht regenerieren.

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, regenerierten alle transformierten Konstrukte nur auf Medium ohne Kanamycin. Sie bildeten Kalli, aus denen sich anschließend Sprosse entwickelten.

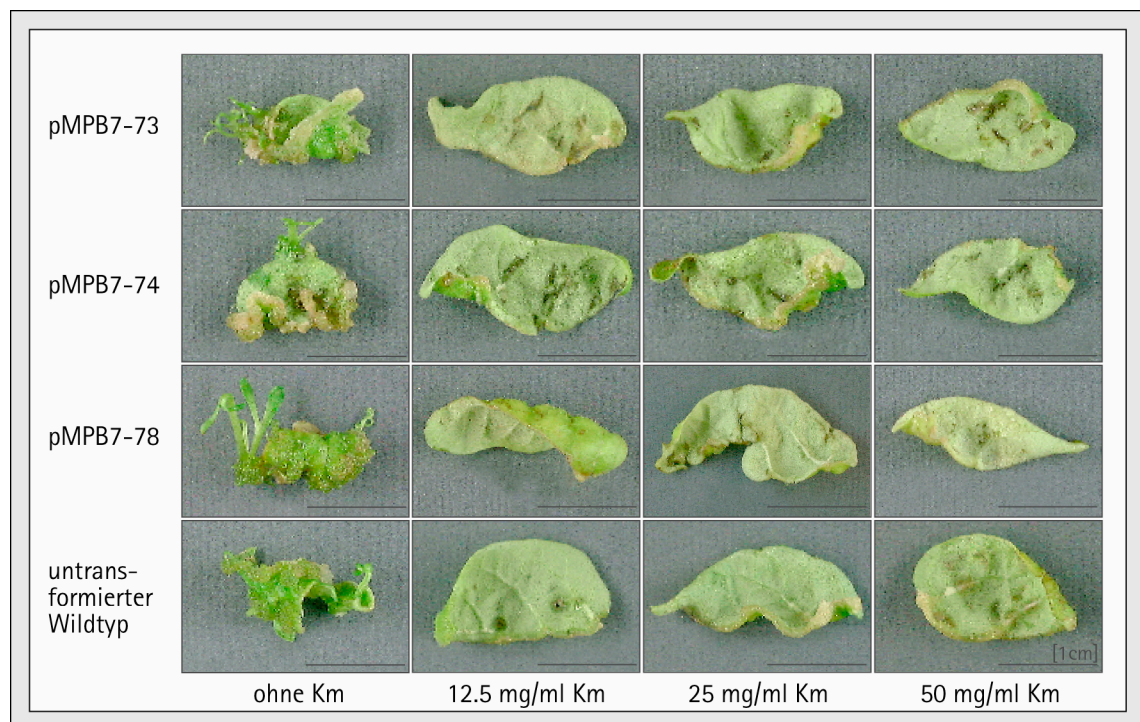


Abb. 3.8 Kartoffelblätter fünf Wochen nach der Transformation. Die Blätter wurden auf CIM- bzw. SIM-Platten mit unterschiedlichen Kanamycin-Konzentrationen gesetzt. Km: Kanamycin.

Auf keinem der Kanamycin-haltigen Medien bildeten sich Kalli oder Sprosse. Durch die Fusion am 3'-Ende des *npt II*-Gens ist also offensichtlich ein Verlust der Enzymaktivität verursacht worden. Die Positivkontrolle regenerierte auf allen Medien (Daten nicht gezeigt).

3.3 Klonierung einer neuen *npt II*-Kassette

Da durch die C-terminale Fusion des *npt II*-Gens mit dem entsprechenden Negativ-Selektionsmarker ein Aktivitätsverlust der NPT II verursacht wurde, wurden neue Konstrukte kloniert, in denen das *npt II*-Gen und *codA*-Gen jeweils unter Kontrolle eines eigenen Promotors und Terminators standen. Um die Anzahl der zu transformierenden Konstrukte in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden die neuen Klonierungen nur mit der Cytosin-Desaminase als Negativ-Selektionsmarker durchgeführt. Die schematische Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 3.9 gezeigt.

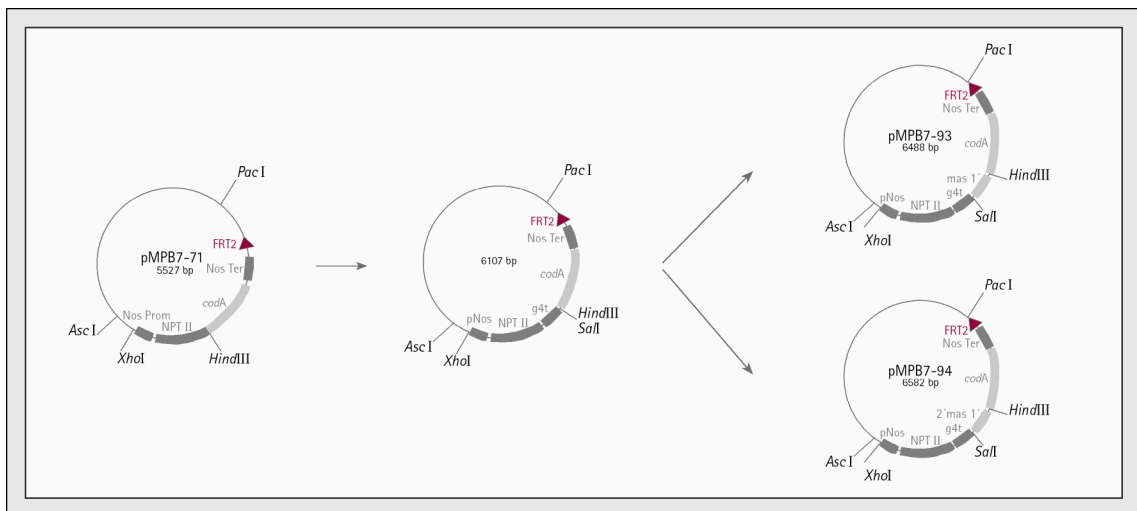


Abb. 3.9 Schematische Darstellung zum Klonierungsschema der neuen *nptII*-Kassette. pNOS, NPTII und g4t wurden mittels PCR amplifiziert und in den Ausgangsvektor pMPB7-71 kloniert. Anschließend wurden die zwei unterschiedlichen mas-Promotoren hinzugefügt. Die beiden entstandenen Kassetten können *via* *AscI/PacI* in den binären Vektor kloniert werden. Nos Prom/Nos Ter: Promotor/Terminator der Nopalin-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *npt II*: Kanamycin-Resistenzgen; g4t: Terminator des g4-Gens aus *A. tumefaciens*; *codA*: Cytosin-Desaminase-Gen; 2'mas1': Doppelpromotor aus *A. tumefaciens*; mas1': verkürzter mas-Promotor aus *A. tumefaciens*.

Ausgangsvektor für die Klonierung der neuen *npt II*-Kassette war der Vektor pMPB7-71. Aus dem Vektor pSR8-30 (s. Kap. 2.3.3) wurde der Nos-Promotor, das *npt II*-Gen und der g4-Terminator mittels PCR amplifiziert und *via* *XhoI/HindIII* in das Plasmid pMPB7-71 kloniert. Aus dem Plasmid pMPB7-89 (s. Kap. 2.3.3) wurde,

ebenfalls über PCR, der MAS-Promotor amplifiziert und über *SalI/HindIII* zwischen den g4-Terminator und das *codA*-Gen inseriert (pMPB7-94). Da es sich bei dem MAS-Promotor um einen Doppelpromotor handelt, wurde zusätzlich zu dem vollständigen Doppelpromotor (Velten *et al.*, 1984) die verkürzte Sequenz, die nur den 1'-Promotor umfasst (Mengiste *et al.*, 1997), amplifiziert (pMPB7-93), um „gene silencing“-Effekte ausschließen zu können. Die zwei neuen Kassetten wurden über *AscI/PacI* aus den Vektoren pMPB7-93 und pMPB7-94 herausgeschnitten und jeweils in die Ausgangsvektoren pMPB7-78, pMPB7-79 und pMPB7-80 transferiert. Die sechs entstandenen binären Konstrukte pMPB7-98 bis pMPB7-103 sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Alle sechs Konstrukte wurden, wie in Kapitel 2.10 beschrieben, stabil in Kartoffel transformiert (Kap. 2.10).

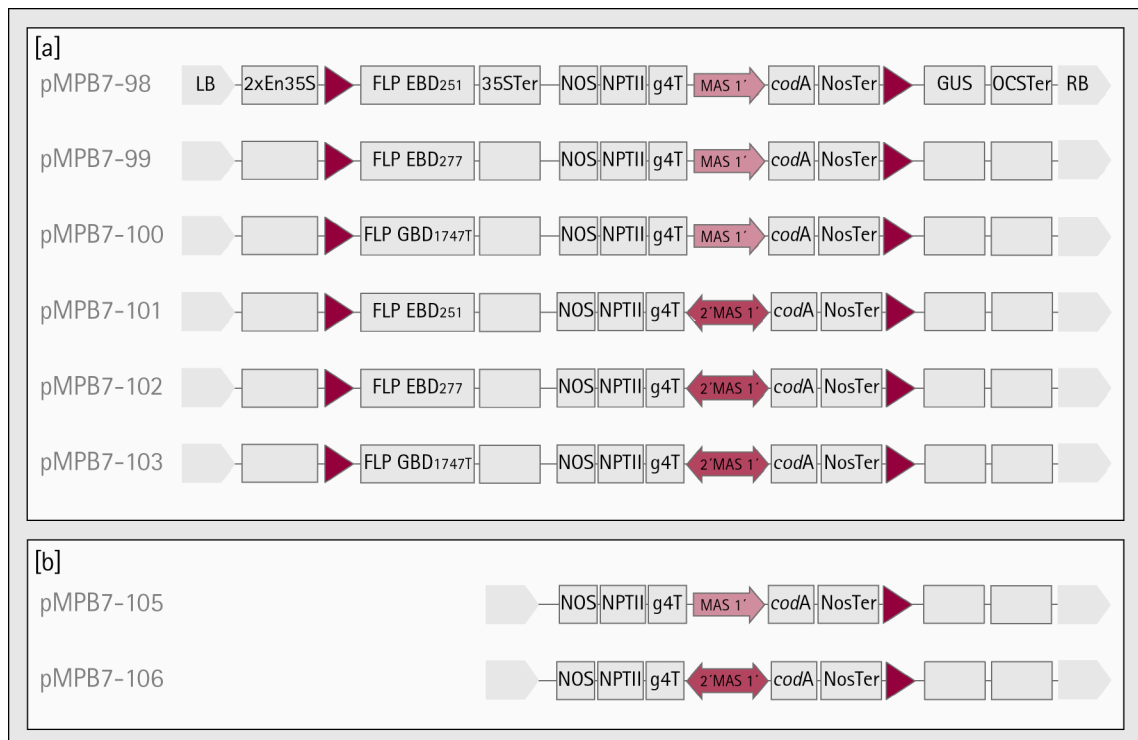


Abb. 3.10 Schematische Darstellung der T-DNA der binären Vektoren mit den neuen *nptII*-Kassetten. Durch die Kombination der verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen und der zwei Negativ-Selektionssysteme sind insgesamt sechs Endkonstrukte entstanden. [a] Binäre Endkonstrukte, [b] Vorkonstrukte. LB/RB: linke/rechte Border; EBD: Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne; GBD: Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne; 2xp35S: 2x 35S-Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus; 35SpA: 35S-Terminator aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus; Nos Prom/Nos Ter: Promotor/Terminator der Nopalin-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *nptII*: Kanamycin-Resistenzgen; g4t: Terminator des g4-Gens aus *A. tumefaciens*; 2' MAS 1': Doppelpromotor aus *A. tumefaciens*; MAS 1': verkürzter MAS-Promotor aus *A. tumefaciens*; *codA*: Cytosin-Desaminase-Gen; GUS: Gen der β -Glucuronidase aus *E. coli*; OCS-Ter: Terminator der Oktopin-Synthase aus *A. tumefaciens*.

3.4 Vergleich der Liganden-Bindungs-Domänen in transienten Tests

Um die Funktionalität der binären Konstrukte unabhängig von der Aktivität des *npt II*-Gens zu testen und erste Hinweise zur Stärke der Hintergrundaktivität und Induktion der verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen (LBD) zu erhalten, wurden transiente Transformationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden *N. benthamiana*-Pflanzen mittels Agrobakterieninfiltration transformiert (Kap 2.10). Zur Induktion der LBD wurden dem Infiltrationsmedium unterschiedliche Konzentrationen an β -Estradiol (Ligand für die Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne, EBD) bzw. Dexamethason (Ligand für die Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne, GBD) beigefügt. Nach fünf Tagen wurden die Blätter geerntet und zur weiteren Analyse eingesetzt.

3.4.1 Analyse der binären Konstrukte pMPB7-75 bis pMPB7-80

Zur Induktion der LBD wurde das Infiltrationsmedium mit 1 μ M und 10 μ M des jeweiligen Liganden versetzt. Um die Hintergrundaktivität bestimmen zu können, erfolgte die Infiltration mit Agrobakteriensuspension außerdem ohne Liganden. Um die Hintergrundaktivität der β -Glucuronidase in *A. tumefaciens* zu testen, wurden die Vorkonstrukte pMPB7-73 (Negativ-Selektionsmarker: TK) und pMPB7-74 (Negativ-Selektionsmarker: CD) als Kontrollen transformiert (vgl. Abb. 3.5). Bei den binären Konstrukten kann erst nach erfolgter Rekombination und Deletion der zwischen den beiden *FRT*sites liegenden DNA-Sequenzen eine Expression des Fremdgens stattfinden. Den Vorkonstrukten fehlt die Rekombinase-Kassette, und somit der benötigte Promotor zur Expression des GUS-Gens. Sofern in den Vorkonstrukten keine Expression der β -Glucuronidase festgestellt werden kann, ist gewährleistet, dass die GUS-Expression nur auf die Rekombinationsereignisse der FLP-Rekombinase zurückzuführen ist.

Die Analyse der mit Agrobakterien infiltrierten Blätter erfolgte sowohl histochemisch anhand der Blaufärbung des Gewebes (s. Kap. 2.7.1), als auch über die enzymatische Aktivitätsbestimmung der β -Glucuronidase in Blattextrakten (s. Kap. 2.7.2). Darüber hinaus wurde die β -Glucuronidase immunologisch im Western-Blot nachgewiesen (s. Kapitel 2.6.5). Wie oben beschrieben kann das GUS-Gen erst nach Deletion der DNA-Sequenzen, die zwischen den beiden *FRT*sites liegen,

exprimiert werden. Die Deletion durch die FLP-Rekombinase sollte im Idealfall nur nach Applikation des jeweiligen Liganden induziert werden. Es ist aber bekannt, dass immer eine gewisse Hintergrundaktivität der FLP LBD zu beobachten ist, eine minimale Aktivität der Rekombinase also auch ohne Induktion vorhanden ist. Da die GUS-Expression mit der Deletion der DNA-Sequenzen zwischen den *FRT*sites gekoppelt ist, können durch die Expressionshöhe des Reportergens Rückschlüsse auf die Effizienz der FLP-Rekombinase nach Induktion im Vergleich zur Hintergrundaktivität geschlossen werden, indem die unterschiedlichen GUS-Expressionsmuster (mit und ohne Ligand) im Verhältnis zueinander verglichen werden.

Mit den Kontrollplasmiden pMPB7-73 und pMPB7-74 (Vorkonstrukte ohne Rekombinase-Kassette) konnte weder eine Hintergrundaktivität der β -Glucuronidase in *A. tumefaciens*, noch Effekte durch die Applikation von 1 μ M und 10 μ M β -Estradiol bzw. Dexamethason beobachtet werden (Abb. 3.11 [a] + [b]). Auch die Negativ-Kontrolle, bei der lediglich die Infiltrationslösung inokuliert wurde, zeigte keine GUS-Expression. Somit ist gewährleistet, dass die beobachteten Effekte nur auf die Rekombinationsereignisse zurückzuführen waren.

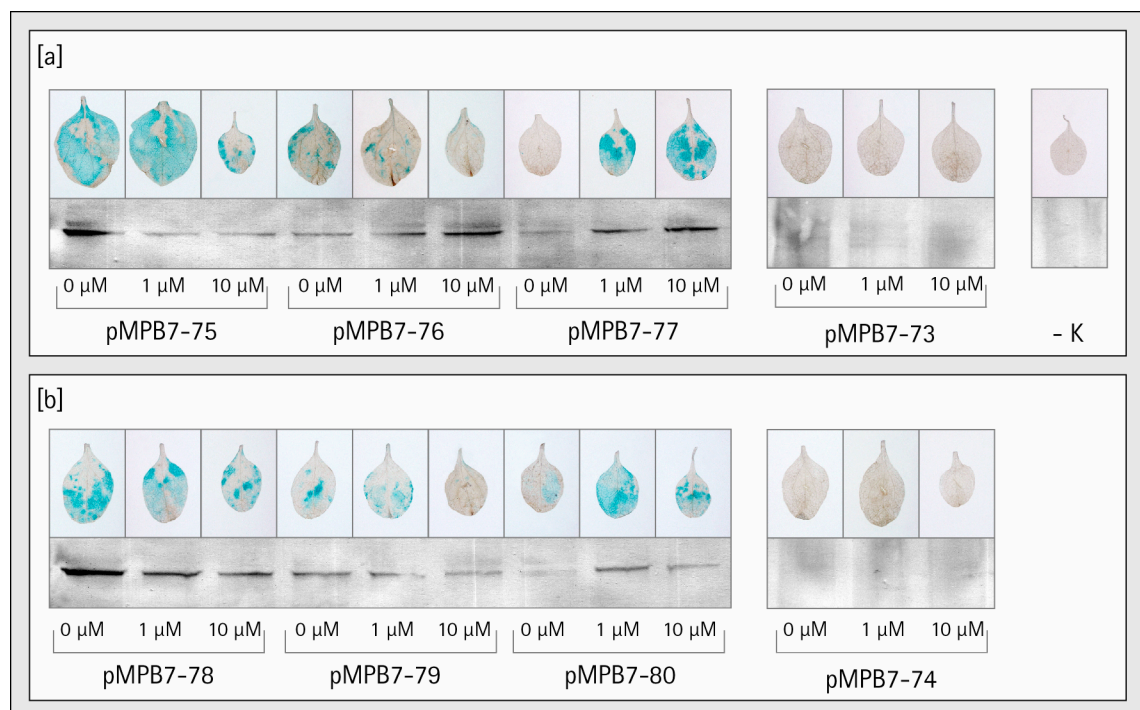


Abb. 3.11 Histochemischer und immunologischer Nachweis der β -Glucuronidase in transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern. Die Pflanzen wurden infiltriert, mit 0, 1 und 10 μ M Ligand induziert und nach fünf Tagen geerntet. [a] Konstrukte mit der Thymidin-Kinase: 7-75: EBD₂₅₁, 7-76: EBD₂₇₇, 7-77: GBD, 7-73: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; [b] Konstrukte mit der Cytosin-Desaminase: 7-78: EBD₂₅₁, 7-79: EBD₂₇₇, 7-80: GBD, 7-74: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette. -K: Kontroll-Pflanze, die mit der Infiltrationslösung ohne Agrobakterien inokuliert wurde.

Aus den GUS-Färbungen (Abb. 3.11 Blätter) und den entsprechenden Western-Blots (Abb. 3.11 Banden) ging hervor, dass die verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen unterschiedlich starke Hintergrundaktivitäten aufwiesen. Die höchste Hintergrundaktivität konnte für die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der EBD₂₅₁ beobachtet werden (Konstrukte 7-75: EBD₂₅₁ + TK und 7-78: EBD₂₅₁ + CD). Nach Zugabe von 1 μ M β -Estradiol konnte anhand der Stärke der Blaufärbung im Vergleich zur Hintergrundaktivität keine Erhöhung der β -Glucuronidaseaktivität beobachtet werden. Auch im Western-Blot wurde keine Erhöhung der β -Glucuronidasemenge festgestellt. Nach Induktion mit 10 μ M β -Estradiol nahm die Stärke der Blaufärbung und auch die Bandenstärke im Western-Blot ab. Für die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der verkürzten EBD₂₇₇ konnte also eine Reduzierung der Hintergrundaktivität im Vergleich zur EBD₂₅₁ beobachtet werden (Konstrukte 7-76: EBD₂₇₇ + TK und 7-79: EBD₂₇₇ + CD). Nach Zugabe von 1 μ M bzw. 10 μ M β -Estradiol wurde, gemessen an der histochemischen Detektion, eine Abnahme der Rekombinase-Aktivität festgestellt. Diese Tendenz konnte im Western-Blot nur für das Konstrukt pMPB7-79 (EBD₂₇₇ + CD) bestätigt werden. Eine sehr niedrige Hintergrundaktivität wurde für die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der GBD beobachtet (Konstrukte 7-77: GBD + TK und 7-80: GBD + CD). Nach Induktion mit 1 μ M bzw. 10 μ M Dexamethason zeigte sich ein deutlicher Anstieg der β -Glucuronidasemenge im Western-Blot und auch visuell im gefärbten Blatt. Unterschiede in der GUS-Expressionsstärke nach Applikation von 1 μ M bzw. 10 μ M Dexamethason wurden nicht beobachtet. Unterschiede zwischen den Konstrukten, die als Negativ-Selektionsmarker die Thymidin-Kinase bzw. die Cytosin-Desaminase besaßen, wurden ebenfalls nicht festgestellt. Die Ergebnisse der transienten Tests deuteten darauf hin, dass die Regulation der FLP-Rekombinase unter Kontrolle der GBD in Pflanzen effizienter funktioniert als unter Kontrolle der verschiedenen EBDs.

Abschließend wurde die Aktivität der β -Glucuronidase in Blattextrakten in einem Enzymassay quantifiziert. Die Daten der fluorimetrischen Messungen korrelierten mit den histochemisch und immunologisch erhaltenen GUS-Expressionsdaten. Besonders deutlich wurde auf enzymatischer Ebene der Unterschied zwischen den einzelnen Hintergrundaktivitäten der drei verschiedenen

Liganden-Bindungs-Domänen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die höchste Hintergrundaktivität der FLP-Rekombinase wurde unter Regulation der EBD₂₅₁ beobachtet (7-75 und 7-78). Nach Zugabe des Liganden wurde keine Erhöhung der Aktivität festgestellt, sondern bis auf eine Ausnahme (7-78 nach Induktion mit 1 μ M β -Estradiol) eine Reduktion der GUS-Aktivität beobachtet. Auch im enzymatischen Assay konnte für die FLP-Rekombinase unter Regulation der EBD₂₇₇ eine niedrigere Hintergrundaktivität im Vergleich zur EBD₂₅₁ beobachtet werden (Konstrukte 7-76 und 7-79). Aber auch hier wurde nach Zugabe des Liganden keine Steigerung, sondern eine Abnahme der Aktivität beobachtet.

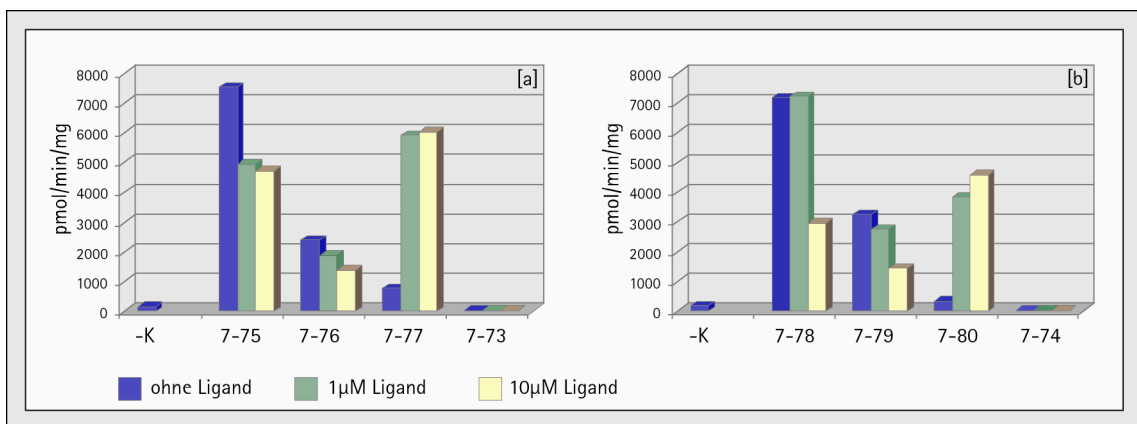


Abb. 3.12 Fluorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität nach Induktion der FLP-Rekombinase mit unterschiedlichen Konzentrationen an den Liganden β -Estradiol (EBD) bzw. Dexamethason (GBD). Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Transformationen angegeben. Eingesetzt wurden jeweils 5 mg/ml Protein. [a] Konstrukte mit der Thymidin-Kinase: 7-75: EBD₂₅₁, 7-76: EBD₂₇₇, 7-77: GBD, 7-73: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; [b] Konstrukte mit der Cytosin-Desaminase: 7-78: EBD₂₅₁, 7-79: EBD₂₇₇, 7-80: GBD, 7-74: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette.; -K: Pflanze, die mit der Infiltrationslösung ohne Agrobakterien inokuliert wurde.

Die niedrigste Hintergrundaktivität zeigte die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der GBD (7-77 und 7-80). Sie war im Vergleich zur EBD₂₅₁ etwa zehnfach, im Vergleich zur EBD₂₇₇ etwa dreifach niedriger. Einen starken Anstieg der Rekombinase-Aktivität konnte nach Induktion mit 1 μ M und 10 μ M Dexamethason gezeigt werden, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen des Liganden ausgemacht werden konnte.

3.4.2 Analyse der binären Konstrukte pMPB7-98 bis pMPB7-103

Parallel wurde die Funktionalität der neuen Konstrukte getestet, die das *codA*-Gen nicht als Fusion mit *npt II* enthalten. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.13 und 3.14 dargestellt.

Die transienten Analysen der neuen Konstrukte bestätigten die Ergebnisse der unter 2.4.1 beschriebenen Experimente. Wie erwartet konnte auch für die neuen binären Konstrukte in transienten Tests die Funktionalität der verschiedenen LBDs gezeigt werden. Ebenso zeigten sich wieder die unterschiedlich starken Hintergrundaktivitäten der verschiedenen LBDs. Sowohl auf histochemischer als auch auf immunologischer Ebene stimmten die beobachteten GUS-Expressionsmuster mit denen der entsprechenden Konstrukte aus den ersten transienten Untersuchungen überein ([7-78 = 7-98 und 7-101], [7-79 = 7-99 und 7-102], [7-80 = 7-100 und 7-103]).

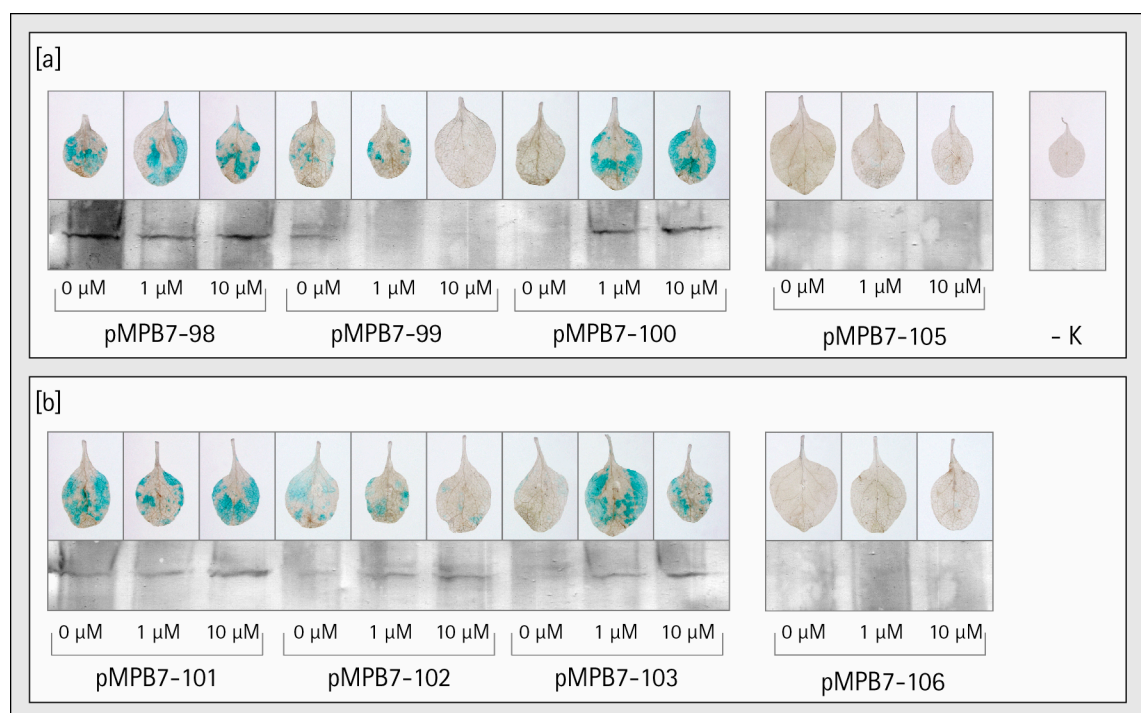


Abb. 3.13 Histochemischer und immunologischer Nachweis der β -Glucuronidase in transient transformierten *N. benthamiana*-Blättern. Die Pflanzen wurden agroinfiltriert, mit 0, 1 und 10 μ M Ligand induziert und nach fünf Tagen geerntet. [a] Konstrukte mit dem verkürzten MAS-Promotor und der Cytosin-Desaminase: 7-98: EBD₂₅₁, 7-99: EBD₂₇₇, 7-100: GBD, 7-105: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; [b] Konstrukte mit dem Doppelpromotor und der Cytosin-Desaminase 7-101: EBD₂₅₁, 7-102: EBD₂₇₇, 7-103: GBD, 7-106: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; -K: Pflanze, die mit der Infiltrationslösung ohne Agrobakterien inokuliert wurde.

Mit den Kontrollplasmiden pMPB7-105 und pMPB7-106 konnte weder eine Hintergrundaktivität der β -Glucuronidase in *A. tumefaciens* noch Effekte nach

Applikation von 1 μM und 10 μM β -Estradiol bzw. Dexamethason beobachtet werden. Auch die Negativ-Kontrolle zeigte keine GUS-Expression nach histochemischer Detektion und keine Bande im Western-Blot. Somit bestätigte sich auch in den hier getesteten Konstrukten nochmals, dass die beobachteten Effekte nur auf die Rekombinationsereignisse zurückzuführen waren und nicht durch eine Agrobakterien-vermittelte Expression der β -Glucuronidase.

Die enzymatische Bestimmung der β -Glucuronidase in Blattextrakten korrelierte ebenfalls mit den histochemisch und immunologisch erhaltenen GUS-Expressionsdaten (Abb. 3.14). Auch hier wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Hintergrundaktivitäten der drei verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen auf quantitativer Ebene deutlich. Entsprechend zeigte sich die höchste Hintergrundaktivität der FLP-Rekombinase nach Fusion mit der EBD₂₅₁ (7-98 und 7-101), eine niedrigere Hintergrundaktivität im Vergleich zur EBD₂₅₁ nach Fusion mit der verkürzten EBD₂₇₇ (7-99 und 7-102), wobei aber auch hier eine Abnahme der Aktivität nach Zugabe des Liganden beobachtet wurde. Kaum Hintergrundaktivität zeigte die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der GBD (7-100 und 7-103). Im Gegensatz zu dem Konstrukt pMPB7-80, bei dem kein signifikanter Unterschied zwischen den gewählten Konzentrationen des Liganden ausgemacht werden konnte, war hier nach Zugabe von 10 μM Ligand eine Abnahme der β -Glucuronidase-aktivität festzustellen.

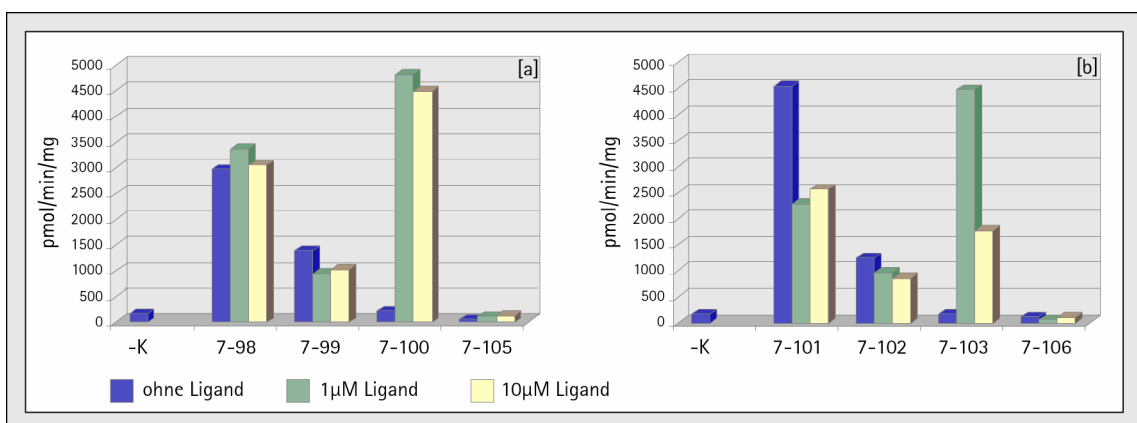


Abb. 3.14 Fluorimetrischer Nachweis der GUS-Aktivität nach Induktion der FLP-Rekombinase mit unterschiedlichen Konzentrationen an den Liganden β -Estradiol (EBD) bzw. Dexamethason (GBD). Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Transformationen angegeben. Eingesetzt wurden jeweils 5mg/ml Protein. [a] Konstrukte mit dem verkürzten MAS-Promotor und der Cytosin-Desaminase: 7-98: EBD₂₅₁, 7-99: EBD₂₇₇, 7-100: GBD, 7-105: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; [b] Konstrukte mit dem Doppelpromotor und der Cytosin-Desaminase: 7-101: EBD₂₅₁, 7-102: EBD₂₇₇, 7-103: GBD, 7-106: Vorkonstrukt ohne Rekombinase-Kassette; -K: Pflanze, die mit der Infiltrationslösung ohne Agrobakterien inokuliert wurde.

3.4.3 Analyse der binären Konstrukte pMPB7-82 bis pMPB7-87

Um für die transienten Analysen der binären Konstrukte mittels Agrobacterium-infiltration zusätzlich zu den durchgeführten Kontrollen vollständig ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte nur auf die Rekombinationsereignisse zurückzuführen waren und nicht durch *A. tumefaciens* selbst hervorgerufen wurden, wurde parallel in allen sechs Konstrukten die GUS-Kassette gegen eine GFP-Kassette ausgetauscht. Die entstandenen Konstrukte pMPB7-82 bis pMPB7-87 sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Als Positiv-Kontrolle wurde Plasmid pMPB7-88 verwendet (s. Kap. 2.3.3).

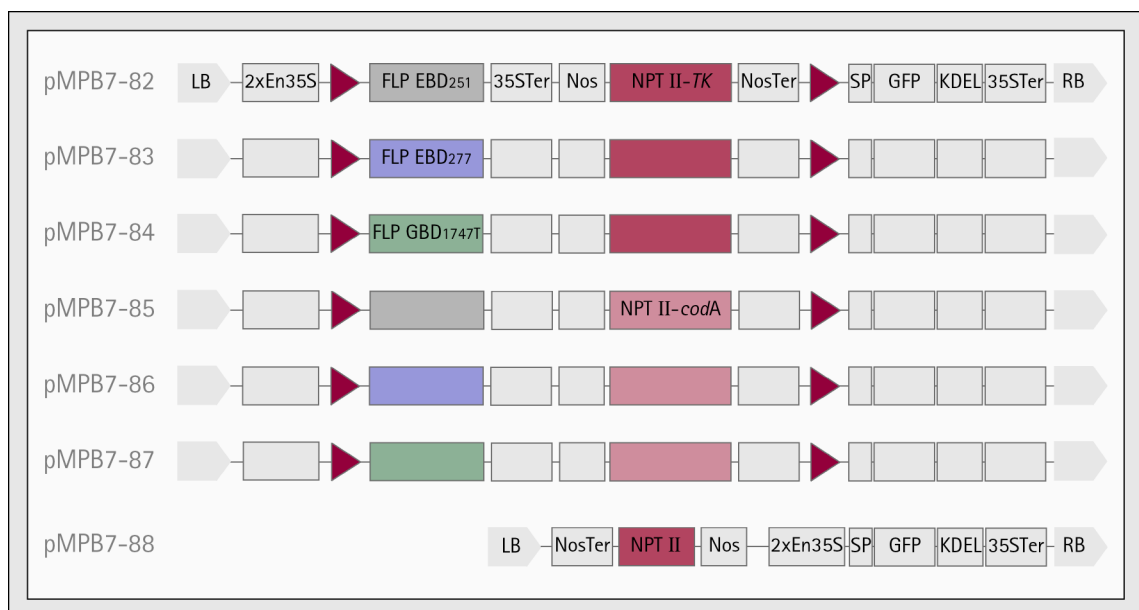


Abb. 3.15 Schematische Darstellung der T-DNA der binären Vektoren mit GFP-Kassette. Die GFP-Kassette wurde via *NcoI/NsiI* aus Plasmid pMPB5-38 herausgeschnitten, in Plasmid pMPB7-69 inseriert und dann über *BstXI* in die binären Vektoren eingebracht. LB/RB: linke/rechte Border; EBD: Östrogen-Liganden-Bindungs-Domäne; GBD: Glucocortikoid-Liganden-Bindungs-Domäne; 2xp35S: 2x 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus; 35SpA: 35S-Terminator aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus; Nos Prom/Nos Ter: Promotor/Terminator des Nopal-Synthase-Gens des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; *npt II*: Kanamycin-Resistenzgen; TK: Thymidin-Kinase-Gen; *codA*: Cytosin-Desaminase-Gen; SP: Signalsequenz der K-Kette eines Maus-Ig; GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; KDEL: C-terminales Tetrapeptid für ER-Retention.

Da eine GFP-Fluoreszenz in *N. benthamiana*-Blättern unter UV-Licht nicht eindeutig zu erkennen war, erfolgte der Nachweis immunologisch über die Detektion mit einem GFP-Antikörper im Western-Blot (Kapitel 2.6.5). Die Ergebnisse mit den binären GFP-Konstrukten korrelierten ebenfalls mit denen der histochemisch, immunologisch und fluorimetrisch untersuchten GUS-Konstrukten (Abb. 3.16). Die höchste Hintergrundaktivität der FLP-Rekombinase wurde auch hier nach Fusion mit der EBD₂₅₁ beobachtet (7-82 und 7-85). Nach Zugabe des Liganden

zeigte sich im Gegensatz zu den GUS-Konstrukten keine Abnahme der GFP-Expression, sondern eine geringe Zunahme. Im Western-Blot zeigt sich kein eindeutiger Unterschied in der Stärke der GFP-spezifischen Signale nach Zugabe von 1 bzw. 10 μM Ligand. Für die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der EBD₂₇₇ konnte im Vergleich zur EBD₂₅₁ eine niedrigere Hintergrundaktivität festgestellt werden (7-83 und 7-86). Auch hier zeigte sich nach Zugabe des Liganden eine Abnahme der GFP-Expression. Die niedrigste Hintergrundaktivität wies die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der GBD auf (7-84 und 7-87). Die GFP-Expression vor Induktion lag hier nahe der Detektionsgrenze des Antikörpers, so dass kaum eine Bande zu erkennen war. Erst nach Induktion mit Dexamethason konnte ein starker Anstieg der Rekombinase-Aktivität gezeigt werden.

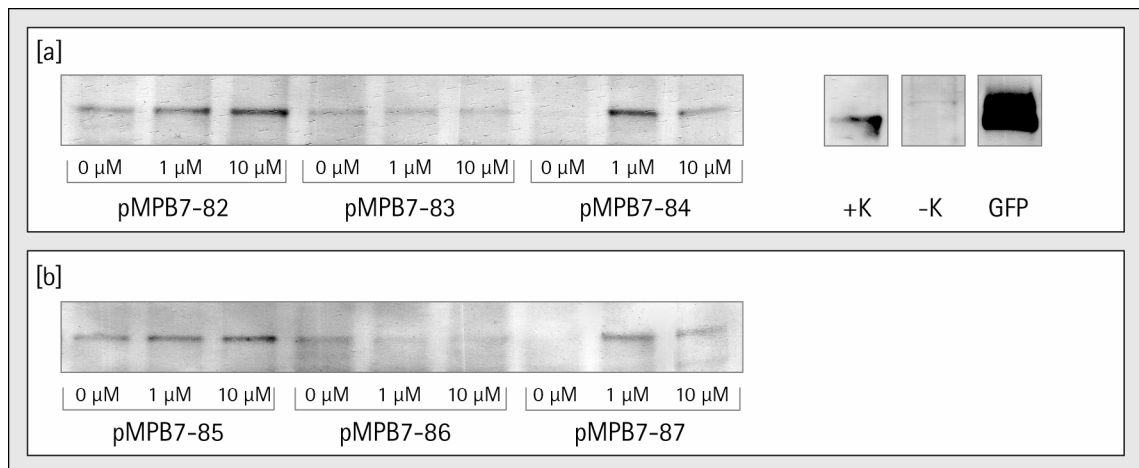


Abb. 3.16 Immunodetektion von GFP nach Agroinfiltration von *N. benthamiana*. Es wurden jeweils 30 μg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. [a] Konstrukte mit der Thymidin-Kinase: 7-82: EBD₂₅₁, 7-83: EBD₂₇₇, 7-84: GBD; [b] Konstrukte mit der Cytosin-Desaminase: 7-85: EBD₂₅₁, 7-86: EBD₂₇₇, 7-87: GBD; +K: pMPB7-88; -K: Pflanze, die mit der Infiltrationslösung ohne Agrobakterien inokuliert wurde; GFP: 5 ng GFP-Protein (Invitrogen).

3.5 Analyse der stabil transformierten Kartoffelpflanzen

Nach Transformation der Kartoffelblätter wurden entstehende Sprosse zum Bewurzeln auf 2CK-Medium gesetzt. Zur Induktion der Rekombinase-Aktivität wurden die Sprosse nach vier Wochen direkt auf Perlite umgesetzt oder ca. 2 cm lange Sprossspitzen abgeschnitten und zum Bewurzeln in Magentadosen mit Perlite überführt (Abbildung 3.17).

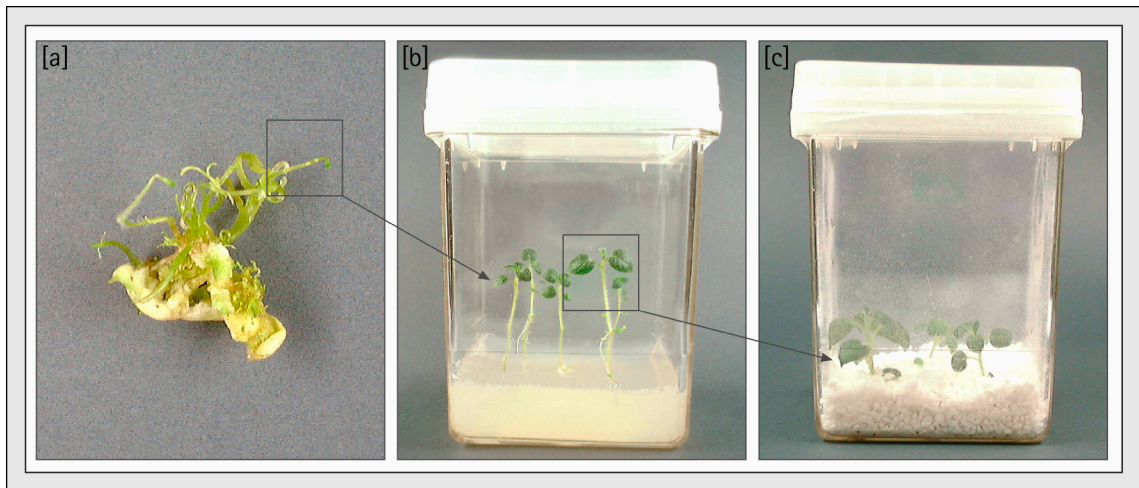


Abb. 3.17 Regeneration stabil transformierter Kartoffelpflanzen. Sich entwickelnde Sprosse wurden bei einer Länge von etwa 2 cm vom Kallus entfernt [a] und zum Bewurzeln auf 2CK-Medium gesetzt [b]. Zur Induktion der Rekombinase-Aktivität wurden die transgenen Pflanzen nach ca. vier Wochen in Magentadosen mit Perlite überführt [c] und mit flüssigem 2MS-Medium, das die entsprechenden Liganden enthielt, gegossen.

Zum Nachweis der Insertion der T-DNA, wurde aus vier Wochen alten Pflanzen genomische DNA isoliert und die T-DNA-Integration in jeweils sechs Linien der Konstrukte pMPB7-98, pMPB7-99 und pMPB7-100 über PCR nachgewiesen. Hierzu wurden Primer gewählt, die etwa 400 bp des MAS-Promotors amplifizierten. Als Kontrolle wurde genomische DNA aus Wildtyp-Pflanzen isoliert und als DNA-Matrize für die PCR eingesetzt. Pro Konstrukt wurden sechs Linien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 dargestellt. In allen sechs Linien der drei verschiedenen Konstrukte konnte das MAS-Promotor spezifische Fragment nachgewiesen werden.

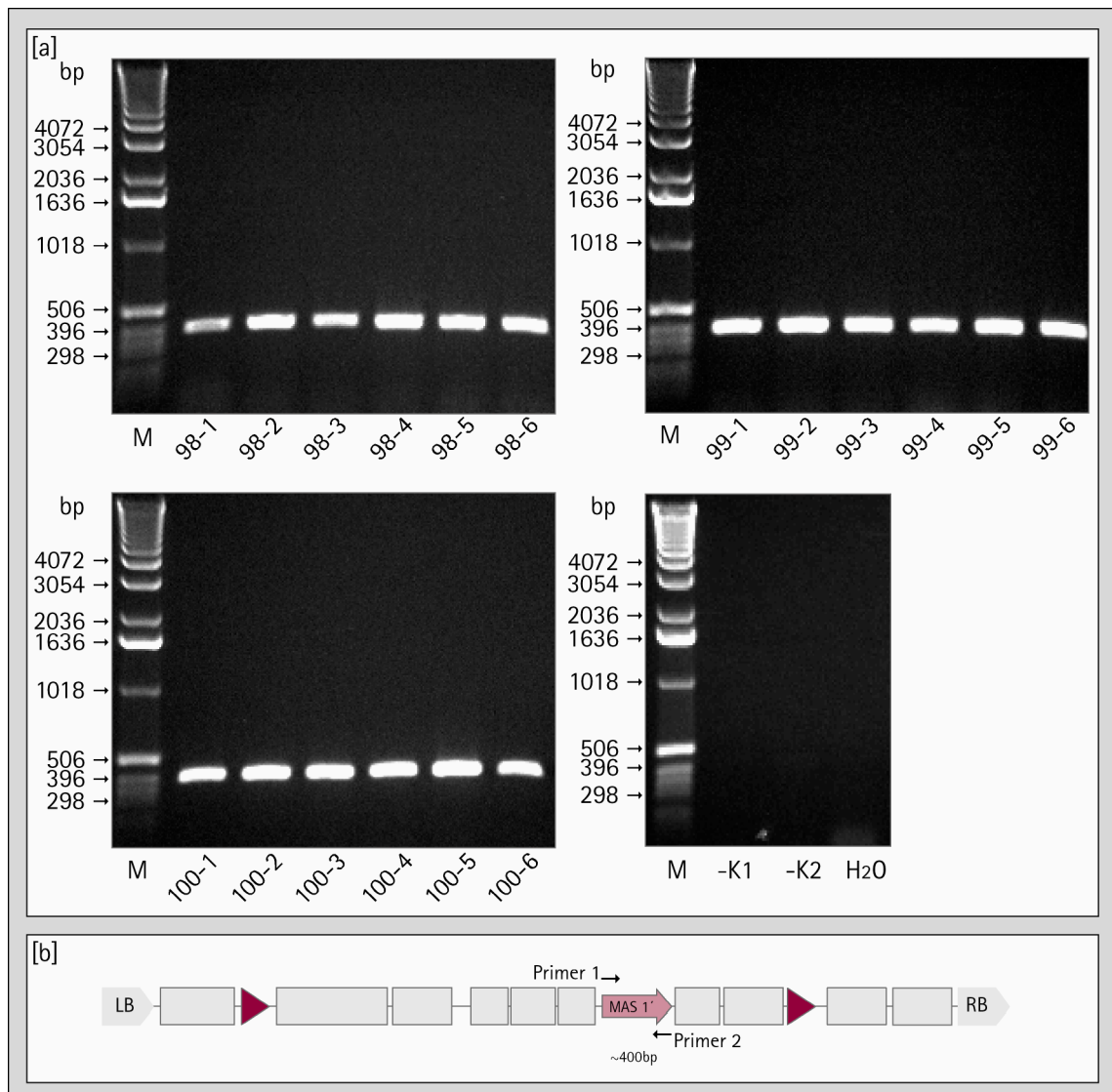


Abb. 3.18 [a] PCR-Nachweis der Sequenz des MAS-Promotors in den Pflanzen der Konstrukte pMPB7-98, pMPB7-99 und pMPB7-100. Es wurden pro Konstrukt sechs Linien untersucht. **[b]** Durch die verwendeten Primer „MasProm Sal up1“ und „MasProm Hind rev“ (Tab. 2.4) wurde ein ca. 400 bp Fragment amplifiziert. M: Marker (1Kb DNA Ladder™); -K1: WT; -K2: WT.

3.5.1 Hintergrundaktivität und Induktion der LBD in stabil transformierten Pflanzen

Zur Analyse der stabil transformierten Blätter wurde das Expressionsmuster der β -Glucuronidase nach erfolgter Induktion der Rekombination untersucht. Die qualitative Analyse erfolgte histochemisch. Um erste Hinweise auf die Hintergrundaktivität der verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen in stabil transformierten Kartoffelpflanzen zu erhalten und Vergleiche zu induzierten Pflanzen ziehen zu können, wurde die GUS-Expression von den über PCR getesteten Linien 1 bis 6 (pMPB7-98, pMPB7-99 und pMPB7-100) und zusätzlich noch in vier weiteren Linien histochemisch detektiert. Anschließend erfolgte an diesen Pflanzen die Induktion. Hierzu wurden 10 μ M β -Estradiol bzw. Dexamethason in flüssigem 2MS-Medium in die mit Perlite gefüllten Magentadosen überführt. Nach 5½ Tagen wurden die Pflanzen auf 2MS-Medium ohne Ligand umgesetzt und etwa vier Wochen später geerntet und nochmals histochemisch analysiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21 dargestellt.

Aus den histochemischen Färbungen geht hervor, dass die verschiedenen Linien des Konstruktes pMPB7-98 (Wildtyp-EBD + CD) unterschiedliche GUS-Expressionsmuster aufwiesen (Abb. 3.19). In den Linien 98-2, -3, -4, -7 und -9 war keine Hintergrundaktivität zu beobachten. Allerdings konnte auch nach Induktion mit dem Liganden keine GUS-Expression in den Kartoffelblättern festgestellt werden. Die Linien 98-7 und -10 zeigten dagegen Hintergrundaktivität. Nach Induktion der Pflanzen konnte aber keine Zunahme der GUS-Expression festgestellt werden. Die Linien 98-5 und -6 zeigten unterschiedlich starke GUS-Expressionsmuster vor Induktion mit dem Liganden. Nach der Induktion konnte eine leicht stärkere Blaufärbung der Blätter beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht induziertem und induziertem Blatt konnte jedoch in der Linie 98-1 beobachtet werden. Diese wies zwar einen starken Hintergrund auf, aber nach Induktion konnten an der Blattspitze größere Bereiche, die komplett blau gefärbt waren, beobachtet werden.

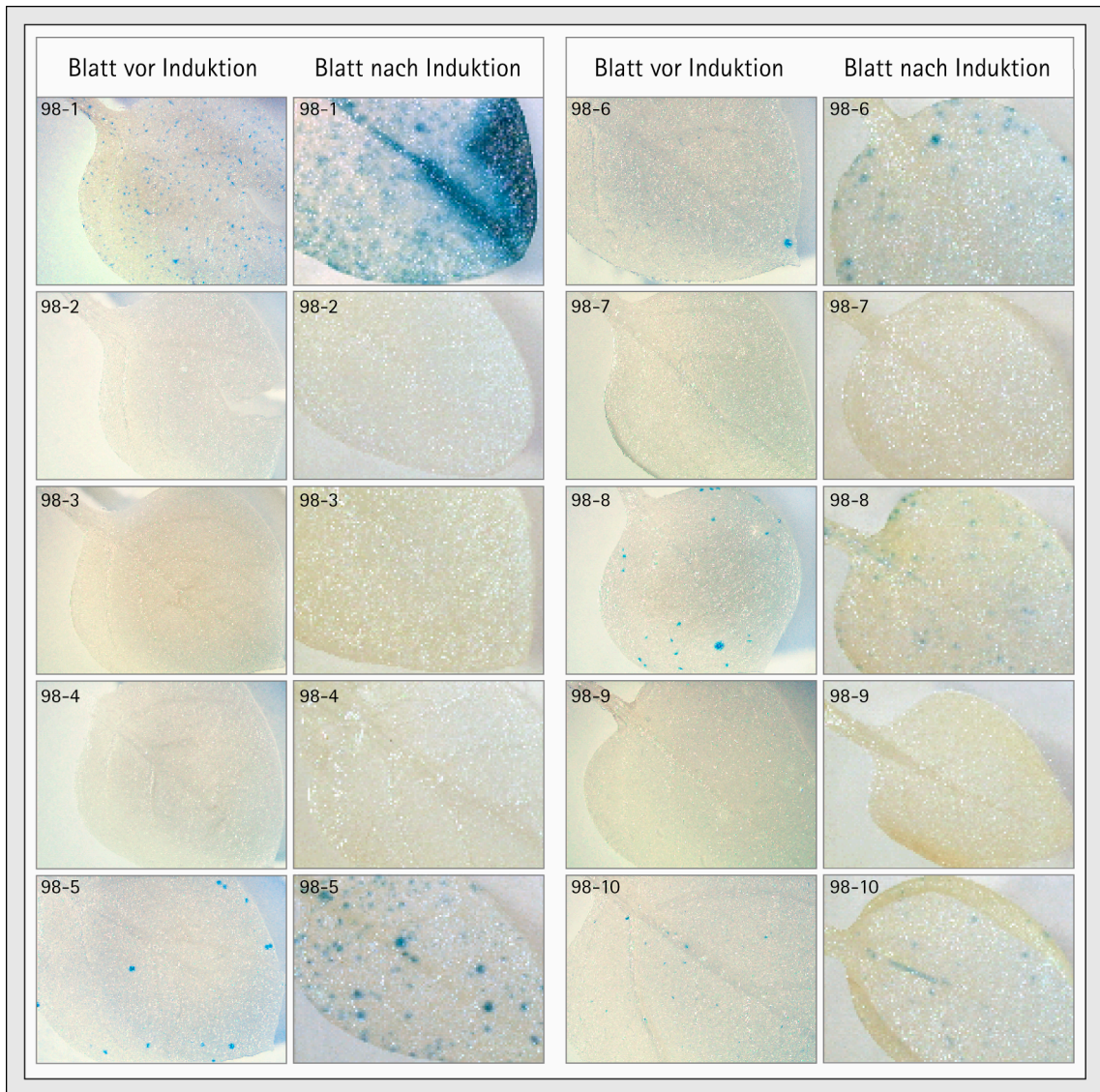


Abb. 3.19 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in mit dem Konstrukt pMPB7-98 (Wildtyp-EBD + CD) stabil transformierten Kartoffelpflanzen vor und nach Induktion mit 10 µM β -Estradiol. Die Blätter wurden mit einer Digitalkamera bei 6.5 x- und 8 x- Vergrößerung unter einem Binokular aufgenommen.

Die zehn getesteten Linien der Pflanzen pMPB7-99 (EBD₂₇₇ + CD) zeigten im Vergleich zu den Linien des Konstruktes pMPB7-98 (EBD₂₅₁ + CD) einen wesentlich schwächeren Hintergrund (Abb. 3.20). In den Linien 99-1, -2, -4, -7 und -9 war weder Hintergrundaktivität noch eine Induktion der GUS-Aktivität in den Kartoffelblättern zu beobachten. Die Linien 99-3 und -5 wiesen ebenfalls keine Hintergrundaktivität auf. Nach Induktion konnte in der Linie 99-3 eine Blaufärbung der Blattspitze, in der Linie 99-5 ein blauer Spot beobachtet werden, aber auch hier wurde kein signifikanter Unterschied vor und nach Induktion festgestellt. Die Linien 99-6, -8 und -10 zeigten vereinzelt GUS-Expression vor und nach Zugabe des Liganden β -Estradiol. Auch hier konnten keine Unterschiede vor und nach der Induktion beobachtet werden.

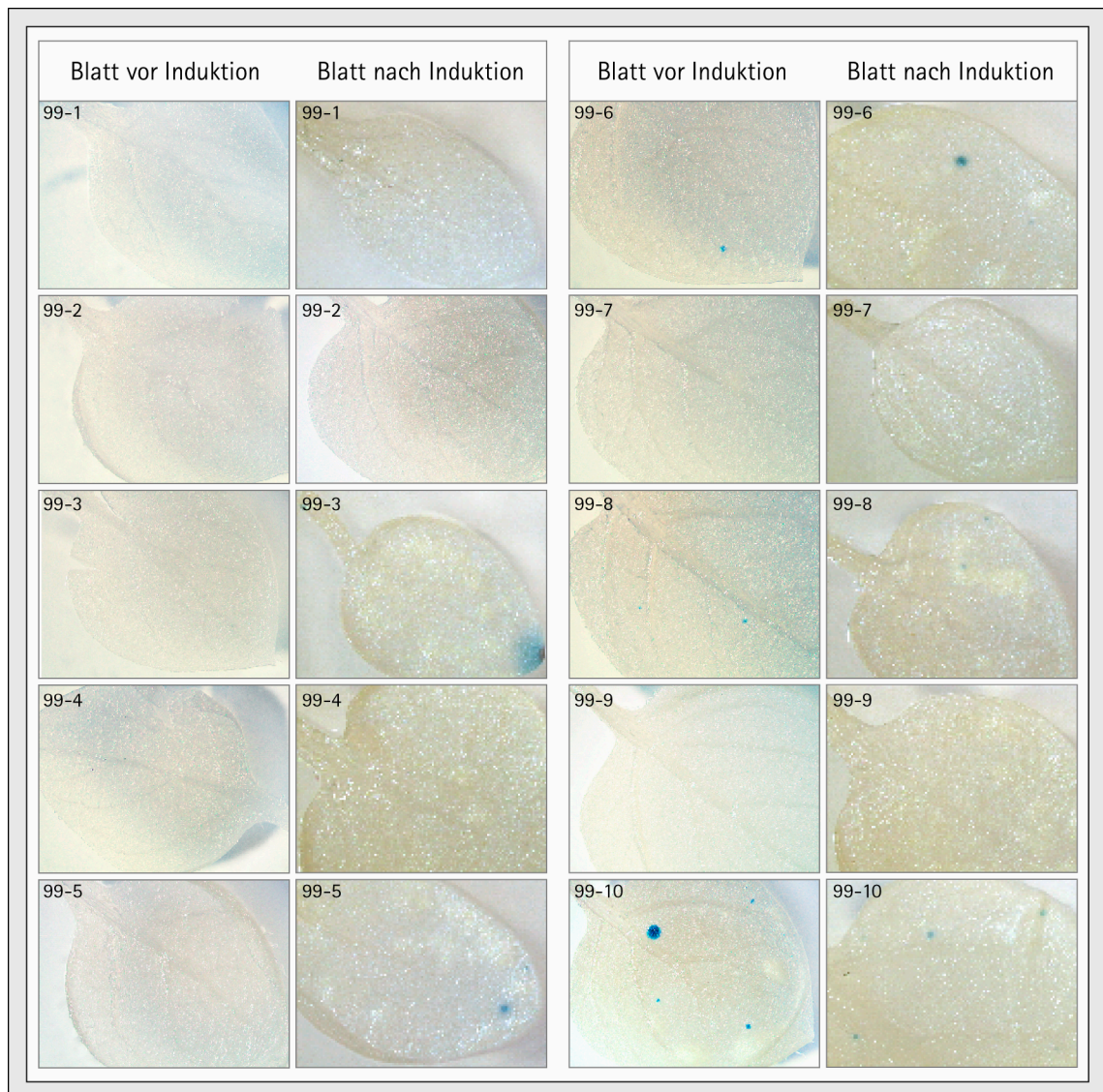


Abb. 3.20 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in mit dem Konstrukt pMPB7-99 (EBD₂₇₇ + CD) stabil transformierten Kartoffelpflanzen vor und nach Induktion mit 10 µM β -Estradiol. Die Blätter wurden mit einer Digitalkamera bei 6.5 x- und 8 x- Vergrößerung unter einem Binokular aufgenommen.

Alle Linien der mit dem Konstrukt pMPB7-100 (GBD + CD) transformierten Kartoffelpflanzen zeigten weder Hintergrundaktivität noch eine Induktion der GUS-Aktivität nach Zugabe des Liganden Dexamethason (Abb. 3.21). Die in den transienten Transformationsexperimenten beobachtete starke Aktivitätssteigerung der GBD nach Induktion mit Dexamethason zeigte sich in den stabil transformierten Kartoffelblättern nicht.

In Tabelle 3.1 sind vergleichend die Ergebnisse der stabil und transient getesteten Liganden-Bindungs-Domänen aufgelistet. Eine eindeutige Induktion konnte nur in den transient getesteten Konstrukten beobachtet werden, bei denen die FLP-Rekombinase mit der GBD fusioniert war.

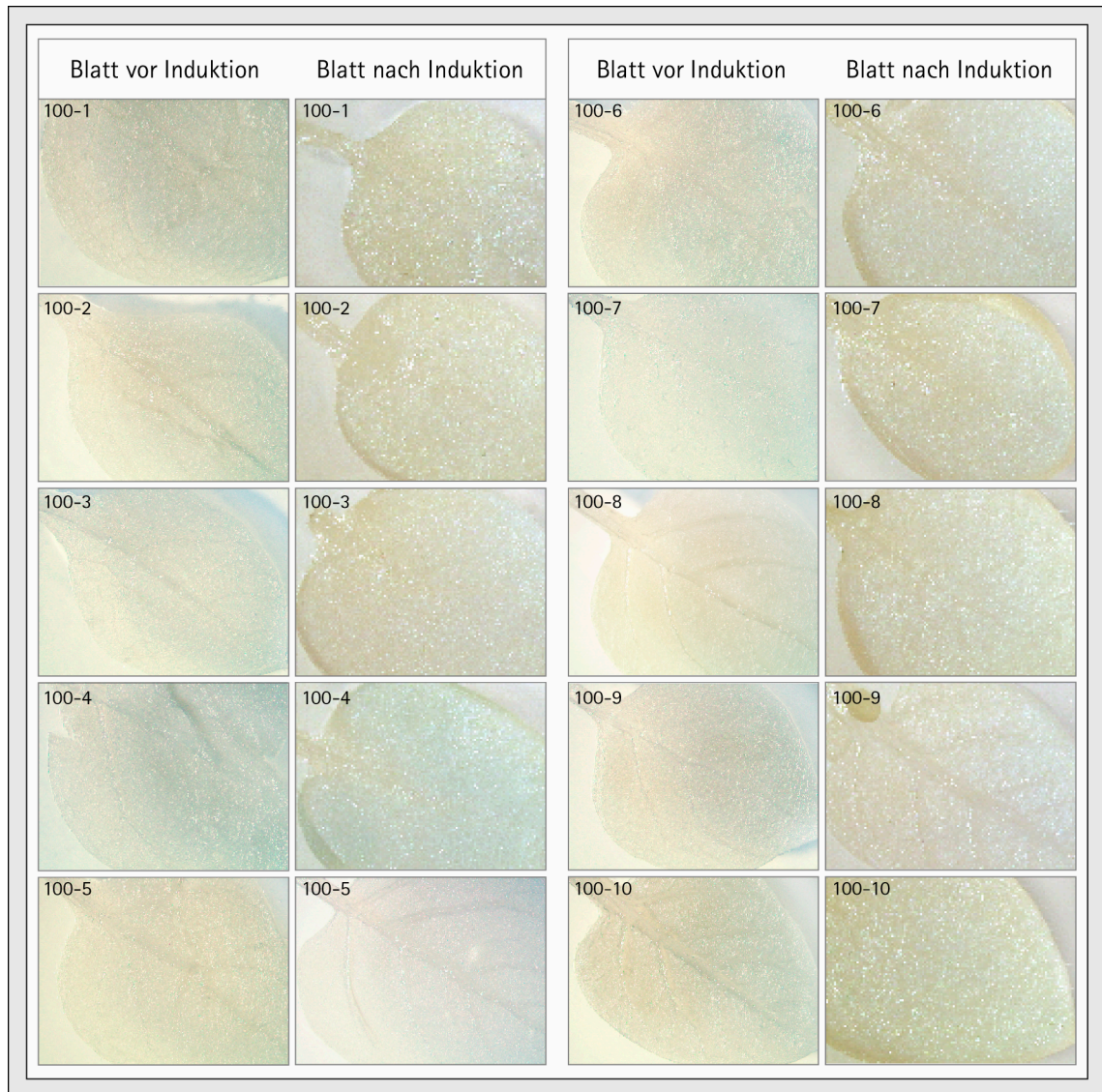


Abb. 3.21 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität in mit dem Konstrukt pMPB7-100 (GBD + CD) stabil transformierten Kartoffelpflanzen vor und nach Induktion mit 10 µM Dexamethason. Die Blätter wurden mit einer Digitalkamera bei 6.5 x- und 8 x- Vergrößerung unter einem Binokular aufgenommen.

Zusammengefasst konnte in den transienten Infiltrationsexperimenten für die FLP-Rekombinase nach Fusion mit der EBD₂₅₁ bzw. der EBD₂₇₇ keine Induktionen nach Zugabe des Liganden detektiert werden. In den transgenen Kartoffeln wurde lediglich für die Linie 98-1 (EBD₂₅₁) ein signifikanter Unterschied nach Zugabe des Liganden beobachtet. Die unterschiedliche Stärke der Hintergrundaktivitäten der einzelnen LBDs zeigten sich jedoch sowohl in den transienten als auch in den stabil transformierten Pflanzen. Der stärkste Hintergrund wurde transient und stabil für das FLP-EBD₂₅₁-Fusionsprotein beobachtet. Eine niedrigere Hintergrundaktivität zeigte sich für FLP-EBD₂₇₇. Die niedrigste bzw. nicht detektierbare Hintergrundaktivität wurde für FLP-GBD festgestellt.

Tab. 3.1: Vergleich der GUS-Expressionsrate/-Aktivität der stabil und transient getesteten LBDs vor und nach Induktion mit 1 µM des jeweiligen Liganden. +++ [sehr stark], ++ [stark], + [schwach], +/- [sehr schwach], - [ohne].

| stabil (Kartoffel) | | | transient (<i>N. benthamiana</i>) | | |
|--------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|
| Konstrukte/Linien | - Ligand | + Ligand | Konstrukte | - Ligand | + Ligand |
| EBD₂₅₁ pMPB7-98/ 1 | ++ | ++ | pMPB7-98 | +++ | +++ |
| pMPB7-98/ 2 | - | - | | | |
| pMPB7-98/ 3 | - | - | | | |
| pMPB7-98/ 4 | - | - | | | |
| pMPB7-98/ 5 | + | +/- | | | |
| pMPB7-98/ 6 | +/- | +/- | | | |
| pMPB7-98/ 7 | - | - | | | |
| pMPB7-98/ 8 | + | - | | | |
| pMPB7-98/ 9 | - | - | | | |
| pMPB7-98/ 10 | +/- | - | | | |
| EBD₂₇₇ pMPB7-99/ 1 | - | - | pMPB7-99 | ++ | ++ |
| pMPB7-99/ 2 | - | - | | | |
| pMPB7-99/ 3 | - | +/- | | | |
| pMPB7-99/ 4 | - | - | | | |
| pMPB7-99/ 5 | - | - | | | |
| pMPB7-99/ 6 | +/- | - | | | |
| pMPB7-99/ 7 | - | - | | | |
| pMPB7-99/ 8 | +/- | - | | | |
| pMPB7-99/ 9 | - | - | | | |
| pMPB7-99/ 10 | + | - | | | |
| GBD pMPB7-100/ 1 | - | - | pMPB7-100 | +/- | +++ |
| pMPB7-100/ 2 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 3 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 4 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 5 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 6 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 7 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 8 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 9 | - | - | | | |
| pMPB7-100/ 10 | - | - | | | |
| | | | pMPB7-75 | +++ | +++ |
| | | | pMPB7-78 | +++ | +++ |
| | | | pMPB7-82 | +++ | +++ |
| | | | pMPB7-85 | +++ | +++ |
| | | | pMPB7-101 | +++ | +++ |
| | | | pMPB7-76 | ++ | ++ |
| | | | pMPB7-79 | ++ | ++ |
| | | | pMPB7-83 | ++ | ++ |
| | | | pMPB7-86 | ++ | ++ |
| | | | pMPB7-102 | ++ | ++ |
| | | | pMPB7-77 | +/- | +++ |
| | | | pMPB7-80 | +/- | +++ |
| | | | pMPB7-84 | +/- | +++ |
| | | | pMPB7-87 | +/- | +++ |
| | | | pMPB7-103 | +/- | +++ |

3.6 Analyse der *FRT*site-Mutanten in transienten Protoplasten Assays

Neben einer effizienten Eliminierung von Markergenen aus transgenen Pflanzen sollte das zu entwickelnde System auch für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können. Hierzu muss gewährleistet sein, dass im Genom verbleibende *FRT*sites bei nachfolgenden Transformationen nicht mehr als Erkennungssequenzen für die FLP-Rekombinase funktionieren können. Die Effizienzen der verschiedenen *FRT*-Mutanten (s. Anhang) wurden in einem transienten Protoplasten-Assay getestet (Abb. 3.22). Dieses Testsystem beruhte auf der Co-Transformation zweier Plasmide in Tabak-Mesophyll-Protoplasten, einem *FRT*-Testplasmid und dem FLP-Expressionsplasmid.

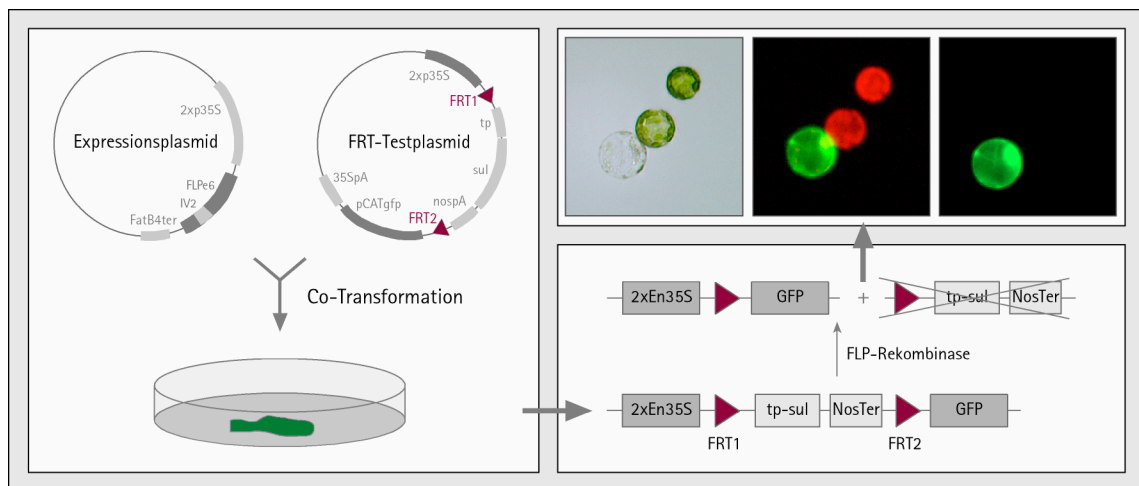


Abb. 3.22 Schematische Darstellung des transienten Protoplasten-Assays zur Überprüfung der Effizienzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten. Die *FRT*site und die FLP-Rekombinase liegen auf zwei unterschiedlichen Plasmiden, die in Tabak-Protoplasten co-transformiert werden. Die *FRT*sites flankieren das Selektionsmarkergen (sul), welches das GFP-Reportergen von dem 2x 35S-Promotor trennt. Nach Eliminierung des Markergens kann die Expression von GFP anhand der Grünfluoreszenz der Protoplasten im Mikroskop nachgewiesen werden. 2xp35S: 2x 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus; tp: Transitpeptid; sul: Sulfonamidresistenzgen; NosTer: Terminator der Nopalin-Synthase des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids; GFP: Grün Fluoreszierendes Protein.

Das *FRT*-Testplasmid (s. Kap. 2.3.3) basiert auf dem GFP-Expressionsplasmid pCATgfp (s. Kap. 2.3.3), wobei die GFP-kodierende Sequenz und der dazugehörige 35S-Promotor durch eine Spacer-Kassette voneinander getrennt wurden. Die Spacer-Kassette besteht aus dem Sulfonamidresistenzgen, das mit der Sequenz für ein plastidäres Transitpeptid fusioniert war und dem Nos-Terminator und wurde von zwei gleichgerichteten 34 bp langen *FRT*sites flankiert. Nach Rekombination und Deletion dieser Kassette war das GFP-Gen nur noch durch eine verbleibende *FRT*site vom Promotor getrennt und konnte exprimiert werden (Abb. 3.22). Das

FLP-Expressionsplasmid (pMPB7-19, s. Kap. 2.3.3) enthält die FLP-Rekombinase mit dem Intron IV2 aus dem Kartoffelgen ST-LS1 (Vancanneyt *et al.*, 1990) unter Kontrolle des zweifachen 35S-Promotors und dem FatB4-Terminationssignal. Das Intron wurde in das Gen der FLP-Rekombinase inseriert, um eine vorzeitige Aktivität der Rekombinase während der transienten Tests im prokaryotischen System zu verhindern. Homologe und heterologe *FRT*-Mutanten wurden miteinander und mit der Wildtyp-*FRT*site kombiniert, so dass 22 von S. Unseld klonierte *FRT*-Testplasmide zur Auswertung innerhalb dieser Arbeit vorlagen. Die einzelnen Mutanten sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

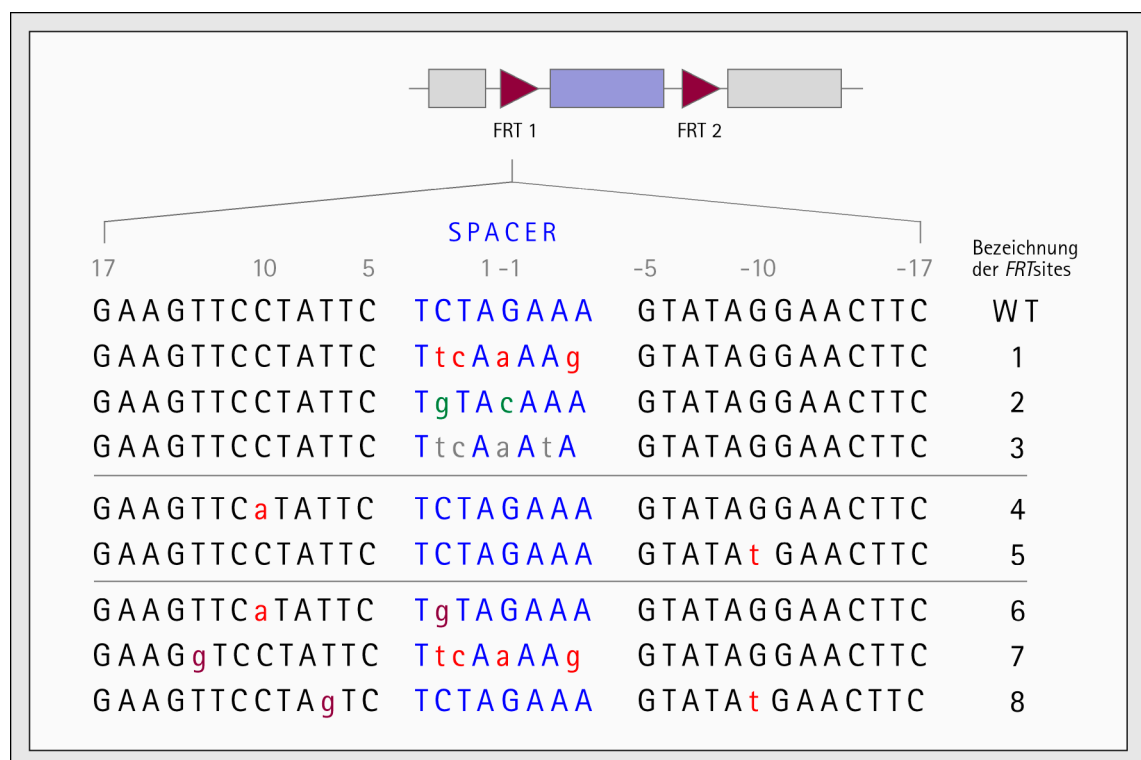


Abb. 3.23 Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten. Die sind farbig hervorgehoben. Durch verschiedene Kombinationen der *FRT*1 und *FRT*2 konnten in transienten Protoplasten-Assays *FRT*sites identifiziert werden, die nicht miteinander rekombinierten und somit für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können. Die Zahlen an der rechten Seite geben die Bezeichnung der einzelnen Mutanten wieder: Wurde z.B. Mutante 1 als *FRT*1 eingesetzt und mit Mutante 3 als *FRT*2 kombiniert, erhielt das Plasmid die Bezeichnung „1-3“.

Die bereits in Hefe- und *E. coli*-Systemen getesteten Mutanten (*FRT*sites 1, 2 und 3 in Abb. 3.22; Umlauf & Cox, 1988; Schlake & Bode, 1996), wurden als Grundlage für die in Pflanzenzellen zu testenden *FRT*sites verwendet. Bei den *FRT*site-Mutanten 4 und 5 wurden an Position 10 bzw. -10 ein Austausch der Base C→a und G→t durchgeführt. Durch diese Punktmutationen sollten die *FRT*sites nach erfolgter Rekombination von der FLP-Rekombinase nicht mehr als Bindungs-

stelle erkannt werden und könnten somit in weiteren Transformationsrunden nicht mehr zu störenden Nebenreaktionen führen (Senecoff *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1991). Aus den Klonierungen sind durch Punktmutationen die *FRT*site-Mutanten 6, 7 und 8 entstandene. Die Rekombinationseffizienzen dieser Testplasmide wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand der Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen erfasst. Als Kontrolle erfolgte die Transformation des Plasmids pCATgfp. Jedes Konstrukt wurde unabhängig voneinander dreimal, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, transformiert, die GFP-Expression in den Protoplasten über zwei Tage beobachtet und mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurde unter Durchlicht die Gesamtzellzahl bestimmt und anschließend unter Fluoreszenzlicht die Anzahl der GFP-exprimierenden Protoplasten. Der prozentuale Anteil der rekombinierten Protoplasten wurde errechnet, die Werte gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. In Abbildung 3.24 [a] sind in einem Diagramm die mit den *FRT*site-Mutanten 1, 2, 3 und 4 erzielten Ergebnisse dargestellt.

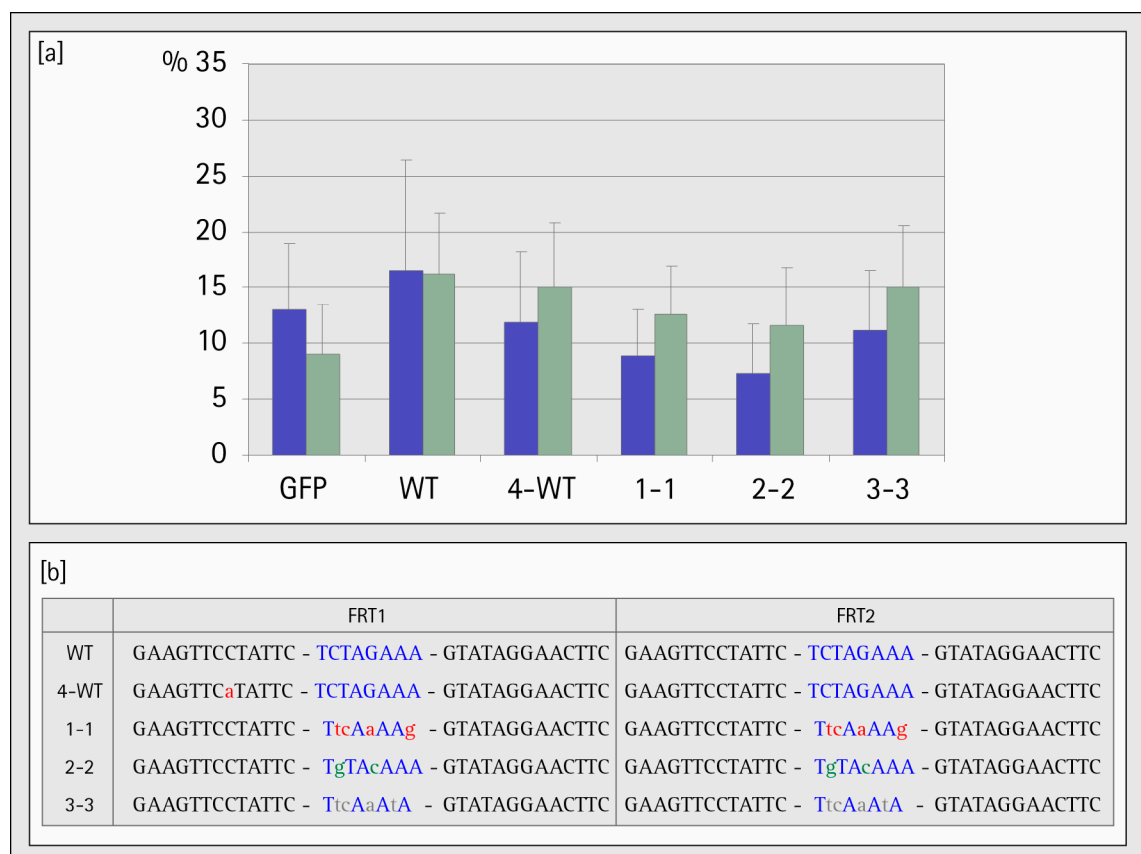


Abb. 3.24 [a] Rekombinationseffizienzen der getesteten *FRT*site-Mutanten. Die im Diagramm dargestellten Effizienzen der verschiedenen *FRT*sites wurden zusammen in einem Transformationsansatz getestet. Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Anteil der fluoreszierenden Protoplasten an der Gesamtheit der Protoplasten (in %). GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; WT: Wildtyp; Blaue Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 1 Tag nach Transformation; Grüne Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 2 Tage nach Transformation. [b] Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten.

Wenn die Mutanten homolog miteinander kombiniert wurden (1-1, 2-2 und 3-3), konnten ähnliche Rekombinationseffizienzen wie bei der Wildtyp-*FRT* erreicht werden. Auch die Punktmutation an Position 10 (C→a) hatte offenbar keinen signifikanten Einfluss auf die Rekombinationseffizienz (4-WT).

Wurde als *FRT1* eine Mutante gewählt und als *FRT2* die Wildtypsequenz eingesetzt (1-WT, 2-WT und 3-WT), fand keine Rekombination und entsprechend keine GFP-Expression statt (Abb. 3.25). Auch bei der Kombination der Mutante 6 als *FRT1* mit dem Wildtyp als *FRT2* (6-WT) wurden keine Rekombinationsereignisse festgestellt.

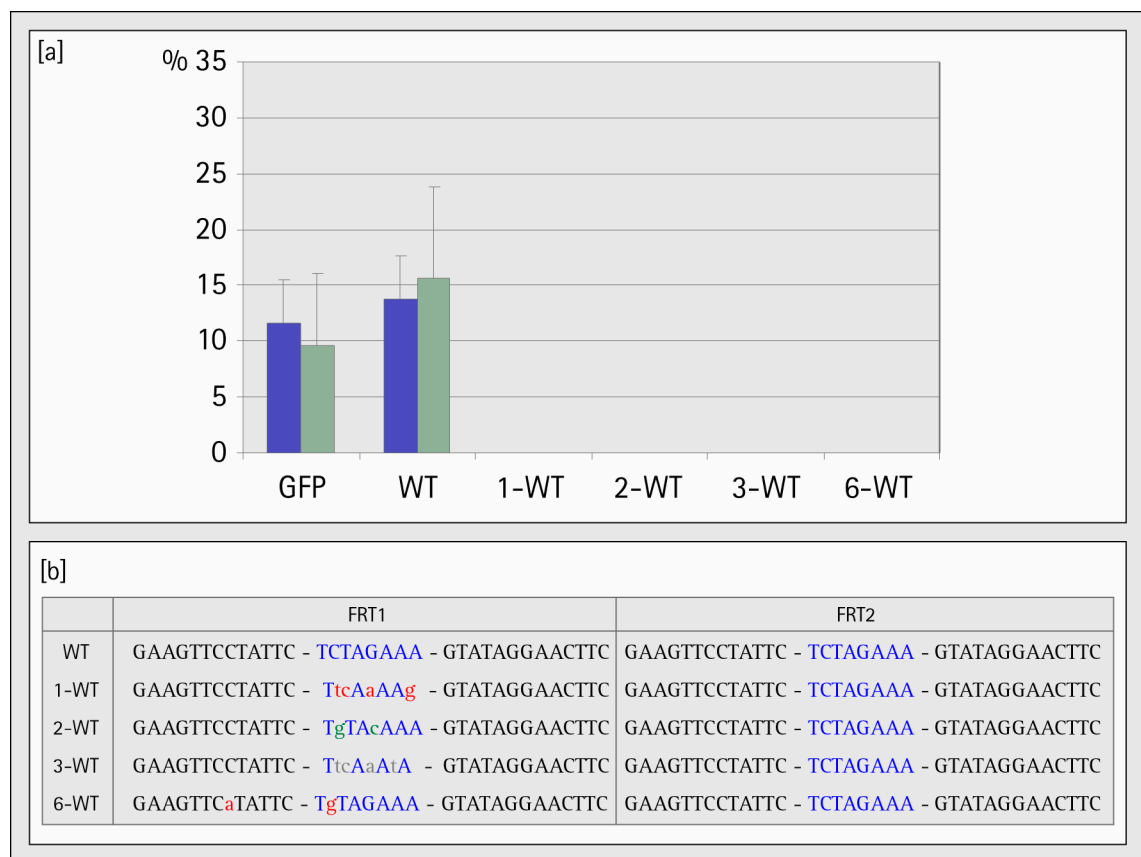


Abb. 3.25 [a] Rekombinationseffizienzen der getesteten *FRT*site-Mutanten. Die im Diagrammen dargestellten Effizienzen der verschiedenen *FRT*sites wurden zusammen in einem Transformationsansatz getestet. Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Anteil der fluoreszierenden Protoplasten an der Gesamtheit der Protoplasten (in %). GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; WT: Wildtyp; Blaue Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 1 Tag nach Transformation; Grüne Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 2 Tage nach Transformation. **[b]** Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten.

Bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Mutanten als *FRT1* und *FRT2* (1-3, 2-3 und 6-5) wurde zwar eine starke Abnahme der Rekombinationshäufigkeit beobachtet, jedoch konnten vereinzelt GFP-exprimierende Protoplasten beobachtet werden (Abb. 3.26). Eine zufällige Punktmutation an Position 7 außerhalb der

Spacer-Region (vgl. auch Abb. 3.23) zeigte keinen starken Effekt auf die Rekombinationseffizienzen (WT-8). Eine einzelne Punktmutation innerhalb des Spacers führte hingegen zu einer starken Abnahme der Rekombinationseffizienz (6-5).

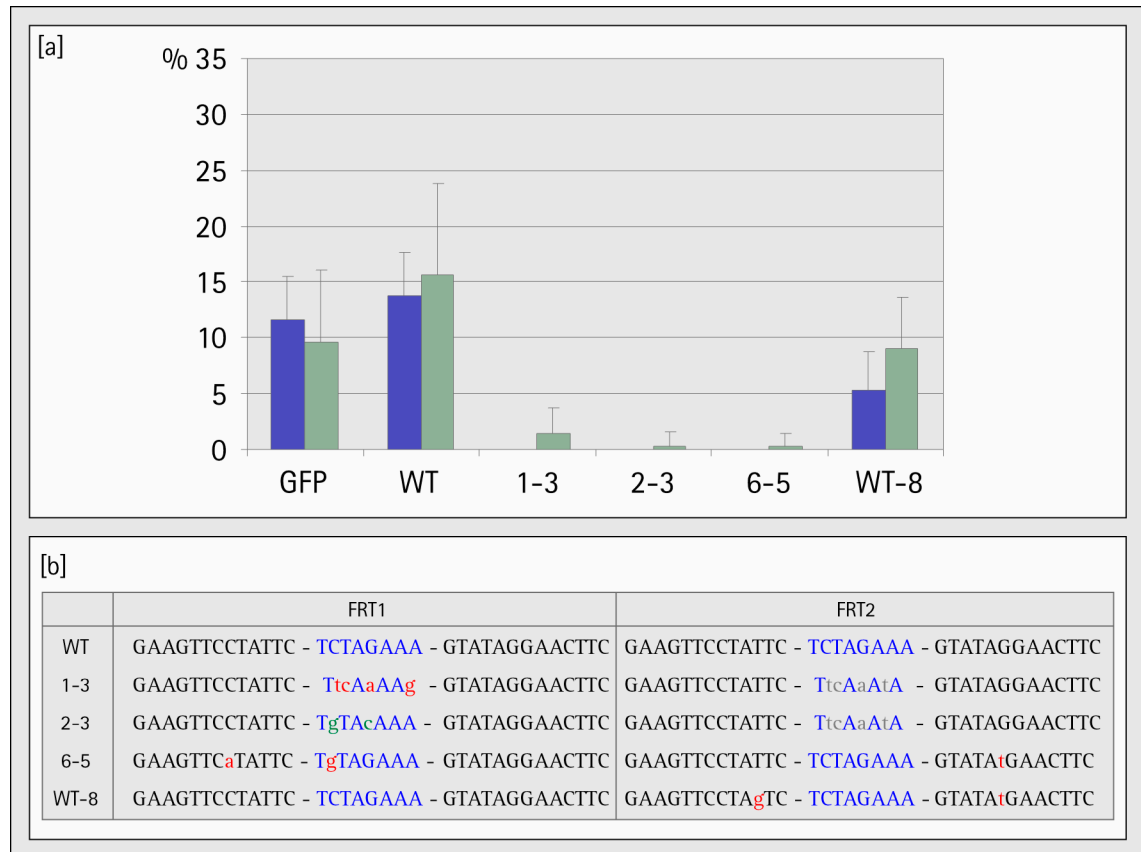


Abb. 3.26 [a] Rekombinationseffizienzen der getesteten *FRT*site-Mutanten. Die im Diagrammen dargestellten Effizienzen der verschiedenen *FRT*sites wurden zusammen in einem Transformationsansatz getestet. Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Anteil der fluoreszierenden Protoplasten an der Gesamtheit der Protoplasten (in %). GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; WT: Wildtyp; Blaue Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 1 Tag nach Transformation; Grüne Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 2 Tage nach Transformation. **[b]** Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten.

Die Punktmutation an Position -10 (G→t) führte zu keinem signifikanten Einfluss auf die Rekombinationseffizienz bei Verwendung homologer Spacer (5-WT). Auch die zufällige Punktmutation an Position 13 (T→g) in der *FRT2* (Abb. 3.27, 1-7) hatte keinen starken Effekt auf die Effizienz der Rekombination im Vergleich zum WT. Wurde die Mutante 2 als *FRT1* mit der Mutante 1 als *FRT2* kombiniert, fand keine Rekombination statt (2-1). Die Punktmutation an Position 10 (C→a) in der *FRT1* zeigte keinen Effekt auf das Rekombinationsverhalten bei der Kombination von WT als *FRT1* und Mutante 3 als *FRT2* (4-3). Bei der Kombination von WT als *FRT1* mit der Punktmutation an Position 10 und Mutante 1 als *FRT2*

wurde zwar eine starke Abnahme der Rekombinationshäufigkeit beobachtet, jedoch wurden hier vereinzelt GFP-exprimierende Protoplasten beobachtet (4-1).

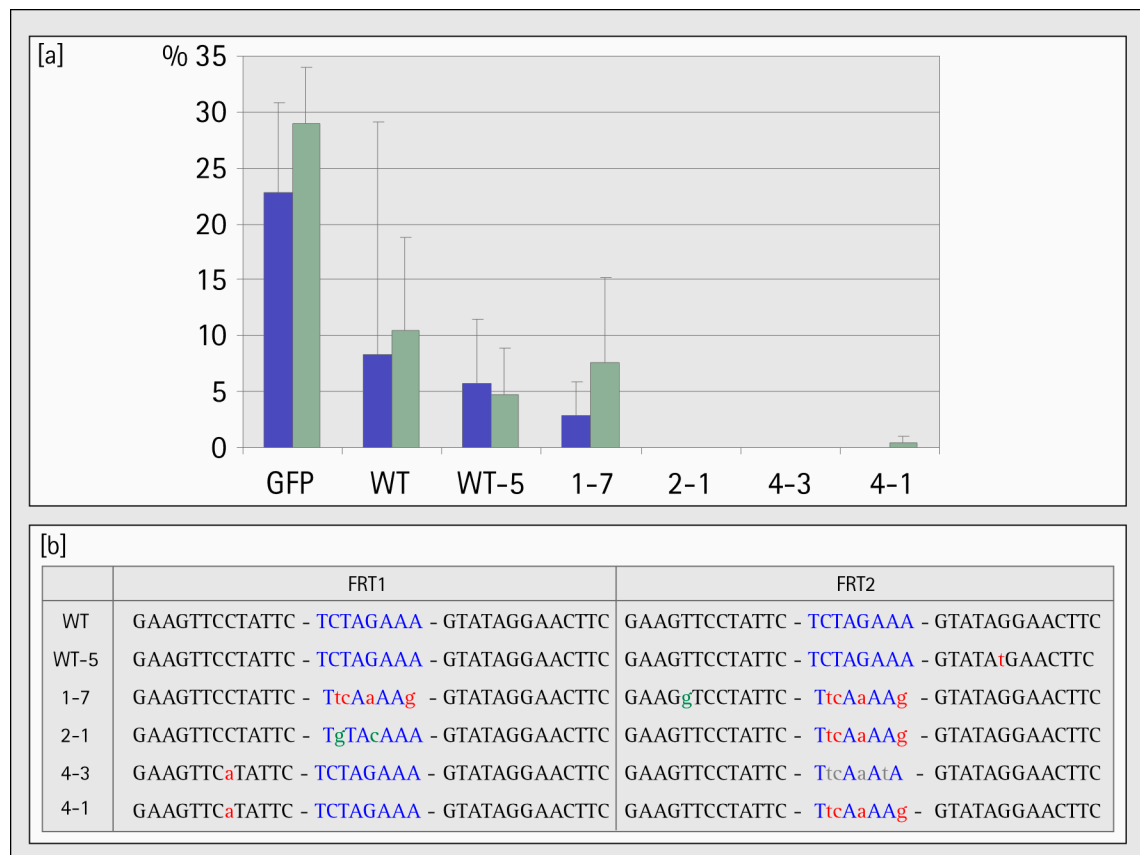


Abb. 3.27 [a] Rekombinationseffizienzen der getesteten *FRT*site-Mutanten. Die im Diagrammen dargestellten Effizienzen der verschiedenen *FRT*sites wurden zusammen in einem Transformationsansatz getestet. Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Anteil der fluoreszierenden Protoplasten an der Gesamtheit der Protoplasten (in %). GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; WT: Wildtyp; Blaue Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 1 Tag nach Transformation; Grüne Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 2 Tage nach Transformation. **[b]** Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten.

Wie aus dem Diagramm in Abbildung 3.25 hervorgeht, wurde kein Rekombinationsereignis bei der Kombination von einer Mutante als *FRT*1 und dem Wildtyp als *FRT*2 beobachtet (1-WT, 2-WT und 3-WT). Bei den *FRT*site-Mutanten 1-5 und 2-5 wurden zusätzlich in *FRT*2 die Punktmutation an Position -10 (G→t) eingeführt. Wie aus dem Diagramm in Abbildung 3.28 [a] zu ersehen ist, üben diese zusätzlich eingeführten Mutationen ebenfalls keinen Effekt auf das Rekombinationsverhalten aus. Es wurden keine GFP-exprimierenden Protoplasten beobachtet. Bei der Kombination von WT als *FRT*1 mit der Punktmutation an Position 10 und Mutante 2 als *FRT*2 wurden ebenfalls keine Rekombinationsereignisse festgestellt (4-2). Nach Kombination der Mutante 1 als *FRT*1 und Mutante

2 als *FRT2* konnten in keiner der drei unabhängigen Transformationen GFP-exprimierende Protoplasten beobachtet werden (1-2).

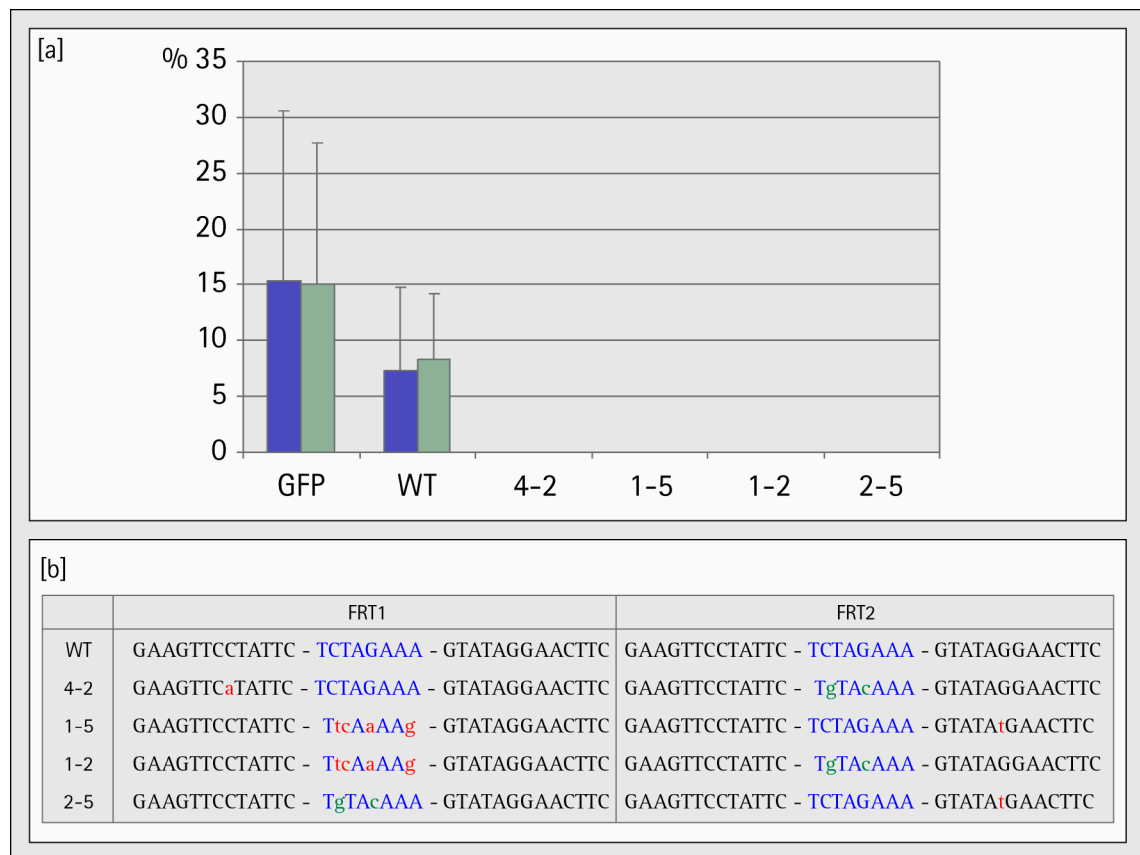


Abb. 3.28 [a] Rekombinationseffizienzen der getesteten *FRT*site-Mutanten. Die im Diagrammen dargestellten Effizienzen der verschiedenen *FRT*sites wurden zusammen in einem Transformationsansatz getestet. Die Angaben beziehen sich jeweils auf den Anteil der fluoreszierenden Protoplasten an der Gesamtheit der Protoplasten (in %). GFP: Grün Fluoreszierendes Protein; WT: Wildtyp; Blaue Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 1 Tag nach Transformation; Grüne Balken: prozentualer Anteil der GFP-exprimierenden Protoplasten 2 Tage nach Transformation. **[b]** Sequenzen der verschiedenen *FRT*site-Mutanten.

Durch Auswertung aller *FRT*-Testplasmide konnten drei *FRT*site-Kombinationen identifiziert werden, die nicht miteinander rekombinierten und somit in jeder Kombination für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können: die Wildtyp-*FRT*site, Mutante 1 und Mutante 2. Dabei muss keine bestimmte Reihenfolge beachtet werden.

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Grundlage für die nachhaltige Etablierung eines neuen Systems zur Entfernung von Markergenen gelegt, dass auch im Hinblick auf eine kommerzielle Anwendung geeignet ist. Neben der Anwendung einer bisher noch nicht in Pflanzen etablierten direkten Regulation der Aktivität eines Enzyms über die Fusion mit der Liganden-Bindungs-Domäne von Steroidrezeptoren, wurde hier auch erstmals ein chemisch induzierbares Expressionssystem mit einem Negativ-Selektionssystem kombiniert, um eine 100 %ige Eliminierung des Markergens und überflüssiger Fremd-DNA zu ermöglichen. Mittels transienter Inokulationsversuche in Tabak konnte gezeigt werden, dass eine Regulation der FLP-Rekombinase auf Proteinebene über die Fusion des Proteins mit der Liganden-Bindungs-Domäne eines Steroidrezeptors auch im pflanzlichen Organismus möglich ist. Dabei wurden Unterschiede in der Effizienz und der Funktionalität der verschiedenen LBDs beobachtet. In transienten Protoplasten-Assays konnte gezeigt werden, dass die in Säugetierzellen und *E. coli* getesteten *FRT*site-Mutanten auch in Pflanzen funktionieren. Die Identifizierung verschiedener *FRT*site-Mutanten, die für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können, erweitern die Einsatzmöglichkeiten dieses neuen chemisch induzierbaren Expressionssystems für Pflanzen. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Ergebnisse diskutiert.

4.1 Vektorsystem und Negativ-Selektionsgen

Die am häufigsten angewendete Transformationsmethode für die meisten dikotylen Pflanzenarten ist nach wie vor die durch Agrobakterien vermittelte. Gene, die in das pflanzliche Genom eingebracht werden sollen, werden hierzu zwischen die linke und rechte Grenze der T-DNA binärer Vektoren kloniert. In der Regel sind herkömmliche binäre Vektoren sehr groß und besitzen meist nur eine Schnittstelle, in die kloniert werden kann. Hinzu kommt, dass durch die Größe des Vektors gängige Restriktionsschnittstellen häufig mehrfach vorkommen und das Klonieren daher äußerst zeitaufwändig und arbeitsintensiv sein kann.

Für die Etablierung des recLBD-Systems in Pflanzen wurden in dieser Arbeit drei Klonierungskassetten hergestellt, die eine einfache und gerichtete Kombination der verschiedenen Komponenten des Rekombinationssystems in einen binären Vektor

ermöglichen. Jede dieser Kassetten wurde in einem modifizierten Vektor kloniert, der sich von den anderen beiden hinsichtlich der flankierenden Restriktionsschnittstellen unterscheidet, über die die Kassetten später in den binären Vektor eingebracht werden können (vgl. Abb. 3.1). Dieses bei MPB-Cologne entwickelte Vektorsystem zeichnet sich durch speziell aufeinander abgestimmte Vorläuferplasmide (Klonierungs- oder Expressionsvektoren) und einen passenden binären Vektor aus. Dadurch ist es möglich, komplexe Konstrukte, wie sie in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, nicht als eine einzige Kasette, sondern über die drei unterschiedlichen Insertionsschnittstellen in den binären Vektor zu transferieren. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Klonierungen der einzelnen Kassetten parallel stattfinden können, wodurch eine erhebliche Zeitersparnis erreicht werden kann.

Um „gene silencing“ durch Verwendung gleicher Promotoren in einem Konstrukt vorzubeugen und gleichzeitig die Größe der resultierenden Konstrukte zu minimieren, wurden Fusionen des Positiv- und Negativ-Selektionsgens analysiert. Als Negativ-Selektionsmarker wurde entweder die Cytosin-Desaminase (*codA*) oder die Thymidin-Kinase (*tk*) eingesetzt, als Positiv-Selektionsmarker die *Neomycin Phosphotransferase II* (*npt II*). Parallel zur stabilen Transformation von Kartoffel wurde die Funktionalität der Fusionsproteine über eine Kanamycin-Konzentrationsreihe getestet. Entgegen unseren Erwartungen regenerierten alle stabil transformierten Konstrukte nur auf Medium ohne Kanamycin (vgl. Abb. 3.8). Auch durch eine Reduzierung der herkömmlich verwendete Km-Konzentration von 50 mg/ml auf 25 mg/ml und 12.5 mg/ml konnte kein Kallus- und Sprosswachstum erreicht werden, was auf einen völligen Verlust der Enzym-Aktivität schließen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde das *npt II*-Gen am 3'-Ende mit dem *codA*-Gen bzw. dem *tk*-Gen fusioniert, da Untersuchungen von Fusionen des *codA*-Gens mit dem Pyromycinresistenzgen (PAC) in Säugetierzellen ergeben hatten, dass die Fusion am 3'-Ende einen Aktivitätsverlust der Cytosin-Desaminase (CD) hervorrief, die Fusion am 5'-Ende jedoch zu einem funktionsfähigem Fusionsprotein führte (Karreman, 1998). Das *tk*-Gen eignet sich sowohl für Fusionen am 3'-Ende als auch am 5'-Ende. Reiss *et al.* (1984) zeigten zwar, dass es bei einer C-terminalen Fusion der *Neomycin Phosphotransferase II* mit einem Protein unter bestimmten Voraussetzungen zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms kommen kann, hierzu aber besonders die Aminosäuresequenz ausschlaggebend ist. So führt vor allem ein Prolin-Rest in unmittelbarer Nähe des C-Terminus der *Neomycin Phosphotransferase II* zu

einem Aktivitätsverlust des Enzyms. Da weder bei der CD noch der Thymidin-Kinase (TK) ein Prolin-Rest an dieser Position existiert und N-terminale Fusionen für beide Marker ohne Verlust der enzymatischen Aktivität möglich sind (Karreman, 1998; Karreman, 2000), sprachen keinerlei Gründe gegen eine C-terminale Fusion, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Neben der Positionierung der Fusion kann einen weiteren Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms die Länge des Linkers zwischen den Fusionsstellen ausüben. In der vorliegenden Arbeit wurde als Linker eine *Hind* III-Schnittstelle zwischen dem Stop-Codon des *npt* II-Gens und dem Start-Codon des Negativ-Selektionsgens gewählt. Karreman (2000) zeigte in seinen Fusionsanalysen, dass weder die CD noch die TK einen längeren Linker zwischen den beiden fusionierten Proteinen benötigen, um aktiv zu sein. Da der Aktivitätsverlust der *Neomycin Phosphotransferase* II anscheinend auch nicht durch den hier verwendeten Linker verursacht wird und alle bekannten Parameter zur NPT-Fusionsproteine beachtet wurden, wurden letztlich Konstrukte kloniert, in denen das *npt* II-Gen und *codA*-Gen jeweils unter Kontrolle eines eigenen Promotors und Terminators standen. Um die Anzahl der Transformationsexperimente in einem überschaubaren Rahmen zu halten, wurden die neuen Klonierungen nur mit der CD als Negativ-Selektionsmarker durchgeführt. Unter Berücksichtigung des Wissens, dass die Effizienz der TK als Negativ-Selektionsgen abhängig von der jeweiligen Pflanzenart ist und jeweils untersucht werden sollte (Czakó *et al.*, 1995) und die Funktionalität der CD in den unterschiedlichsten pflanzlichen Organismen, wie z.B. *Arabidopsis* (Perera *et al.*, 1993), Tabak (Stougaard, 1993), *Lotus japonicus* (Stougaard, 1993;), Gerste (Koprek *et al.*, 1999) und Reis (Dai *et al.*, 2001). gezeigt werden konnte, scheint *codA* als Negativ-Selektionsgen geeigneter zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit waren Untersuchungen zur Negativ-Selektion jedoch nicht vorgesehen.

4.2 Vergleich der Liganden-Bindungs-Domänen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Funktionalität des von Logie & Stewart (1995) entwickelten induzierbaren recLBD-Systems in Pflanzen getestet. Bei den bisher in Pflanzen auf Grundlage von Steroidhormonrezeptoren entwickelten induzierbaren Expressionssystemen findet die Regulation der Expression auf Ebene der Transkription statt. Das Neue des hier getesteten induzierbaren Systems besteht in der

Regulation der Enzym-Aktivität durch Fusion mit der Liganden-Bindungs-Domäne eines Steroidrezeptors. Ein Vorteil dieses Systems besteht darin, dass eine „doppelte Kontrolle“ und damit eine sehr genaue Regulation erzielt werden kann, indem z.B. ein spezifischer Promotor (zeitlich und/oder räumlich) zur Expression der LBD-Fusion verwendet wird und anschließend die Aktivität des exprimierten Enzyms durch Zugabe des Liganden reguliert wird.

In dieser Arbeit wurde zur Entfernung der Markergene das FLP/*FRT*-System aus *S. cerevisiae* verwendet. Im Idealfall sollte die Sequenz-spezifische Rekombination durch das recLBD-Fusionsprotein erst nach Zugabe eines Liganden induziert werden. Die Problematik einer niedrigen Hintergrundaktivität wurde aber auch in diesem System festgestellt. So beobachteten Logie & Stewart (1995) in Säugetierzell-Versuchen auch ohne Zugabe des Liganden eine Aktivität des Enzyms, und zwar unabhängig davon, mit welchem Steroidrezeptor das Protein fusioniert war. Weitere Untersuchungen zur Optimierung dieses Systems in Hefe zeigten, dass durch die Verkürzung der D-Domäne des Östrogenrezeptors eine Abnahme der Hintergrundaktivität erreicht werden konnte (Nichols *et al.*, 1997). In Anlehnung an diese Mutationsstudien wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Östrogen-Bindungs-Domänen (EBD₂₅₁ und EBD₂₇₇; vgl. Abb. 3.3) und zusätzlich die Glucocortikoid-Bindungs-Domäne (GBD) getestet, um das Verhalten der verschiedenen LBDs im pflanzlichen System vergleichen zu können und die hierfür am besten geeignete zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde in transienten Inokulationsversuchen mit Agrobakterien die Hintergrundaktivität und Induzierbarkeit der drei verschiedenen Liganden-Bindungs-Domänen untersucht. Da die GUS-Expression an die Deletion der DNA-Sequenzen zwischen den *FRT*sites gekoppelt ist, können durch die Expressionshöhe des Reportergens Rückschlüsse auf die Effizienz der FLP-Rekombinase nach Induktion und auf die Hintergrundaktivität gezogen werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass sich alle drei Liganden-Bindungs-Domänen in der Stärke der jeweiligen Hintergrundaktivität und auch in ihrem Induktionsverhalten unterscheiden (Abb. 3.11 bis 3.16). Die höchste Hintergrundaktivität wurde für die FLP-Rekombinase, die mit der Wildtyp-Variante der Östrogen-Bindungs-Domänen (EBD₂₅₁) fusioniert war, beobachtet. Nach Zugabe des Liganden β -Estradiol zeigte sich aber keine Induktion der β -Glucuronidase, es wurde im Gegenteil sogar eine Abnahme

der GUS-Expression beobachtet. In Säugetierzellen wurde zwar auch Hintergrundaktivität der Wildtyp-EBD festgestellt, aber trotzdem konnte ein starker Anstieg der Rekombinase-Aktivität nach Zugabe des Liganden beobachtet werden (Logie & Stewart, 1995). Für die FLP-Rekombinase, die mit der verkürzten EBD₂₇₇ fusioniert war, wurde im Vergleich zur EBD₂₅₁ eine geringere Hintergrundaktivität festgestellt. Aber auch hier konnte keine Induktion nach Zugabe des Liganden beobachtet werden. Nichols *et al.* (1997) beschrieben für den Mutationsklon EBD₂₈₆, bei dem die ersten 35 Aminosäuren deletiert wurden, eine Reduktion der Hintergrundaktivität im Vergleich zur Wildtyp-Variante. Gleichzeitig beobachteten sie aber auch, dass durch die Deletion der D-Domäne die Induzierbarkeit der Rekombinase durch den Liganden abgenommen hatte. Zuo *et al.* (2001) verwendeten in *Arabidopsis* ebenfalls die verkürzte EBD₂₈₆ zur Induktion eines Promotors auf Transkriptionsebene. Sie zeigten eine hohe Induzierbarkeit des Gens nach Zugabe des Liganden, beschrieben aber weder Hintergrundaktivität noch die Abnahme der Induzierbarkeit durch Verkürzung der D-Domäne.

Eine Erklärung für die hohe Hintergrundaktivität können die in vielen Pflanzenarten vorkommenden Phytoöstrogene sein. 1954 beschrieben Bradbury & White 53 verschiedene Pflanzen, die über genügend Östrogen-ähnliche Verbindungen verfügten, um bei Tieren den Östruszyklus einzuleiten. Farnsworth *et al.* (1975) erweiterten diese Liste auf über 300 Pflanzenarten. Als Phytoöstrogene werden diphenolische Verbindungen bezeichnet, die strukturelle Ähnlichkeiten zu natürlichen und synthetischen Östrogenen aufweisen und in Pflanzen vorkommen (Kurzer & Xu, 1997). Sie schützen die Pflanzen vor Pilzbefall und ultravioletter Strahlung, wehren Pflanzenschädlinge ab und spielen in der Regulation der Phytohormone eine wichtige Rolle. Man unterscheidet die hauptsächlich aus Leguminosen, wie z.B. Sojabohnen stammenden Isoflavone, die in Getreide, Früchten und Gemüse auftretenden Lignane, sowie die Coumestane zum Beispiel aus Luzerne (Murkies *et al.*, 1998). Shutt & Cox (1972) zeigten schon Anfang der siebziger Jahre, dass Phytoöstrogene an tierische Östrogenrezeptoren binden können. Durch Phytoöstrogene ausgelöste antiöstrogene Effekte wurden von Adlercreutz *et al.* (1995) beschrieben. Sie beobachteten, dass Phytoöstrogenen im Überschuss mit dem endogenen Östrogen um die Bindung am Östrogenrezeptor konkurrierten und in Säugetieren Östrogen-stimuliertes Wachstum verhindern konnten. Der Verlust der Induzierbarkeit der EBD-Fusionsproteine könnte

also möglicherweise eine Folge der im Tabak natürlich vorkommenden Phytoöstrogene sein. Nach wie vor stellt sich aber die Frage, wieso diese Abnahme weder in den Untersuchungen von Lloyd *et al.* (1994) noch von Zuo *et al.* (2001) beschrieben wurden. Beide Arbeitsgruppen setzten Östrogen-induzierte Expressionssysteme zur Regulation von Genen in *Arabidopsis* ein. Lloyd *et al.* (1994) fusionierten den Östrogenrezeptor mit einem Transkriptionsregulator aus Mais und beobachteten eine Liganden-abhängige Induktion, aber auch eine sehr hohe Hintergrundaktivität. Auf Grund der hohen Hintergrundaktivität analysierten sie diese transformierten Pflanzen jedoch nicht näher, sondern konzentrierten sich auf parallel transformierte Pflanzen, bei denen der Glucocortikoidrezeptor eingesetzt wurde. Zuo *et al.* (2001) fusionierten die EBD mit Transkriptionsfaktoren, beschrieben aber keine Hintergrundaktivität. In den bisher verwendeten induzierbaren Expressionssystemen findet die Regulation der Gene auf Transkriptionsebene statt, bei dem hier beschriebenen System wird direkt die Aktivität eines Enzyms reguliert. Die Transkription findet ausschließlich im Zellkern statt, die Aktivität eines Enzyms kann sowohl im Cytosol, als auch im Kern reguliert werden. Möglicherweise könnte darin eine Antwort für das unterschiedliche Induktionsverhalten unter Verwendung von β -Estradiol als Ligand zu finden sein. Bisher gibt es aber noch keine Publikationen zu Untersuchungen in Pflanzen, die sich mit der Problematik von Phytoöstrogenen beim Einsatz von Steroidhormonrezeptoren befassen.

Zusätzlich zu den EBDs wurde die Hintergrundaktivität und Induzierbarkeit der Glucocortikoid-Bindungs-Domäne (GBD) untersucht. Hierbei wurde für die FLP-Rekombinase, die mit der GBD fusioniert war, die niedrigste Hintergrundaktivität beobachtet. Nach Zugabe des Liganden Dexamethason konnte ein sehr starker Anstieg der β -Glucuronidaseaktivität im Western-Blot, histochemisch im gefärbten Blatt und in den fluorimetrischen Messungen für alle getesteten Konstrukte beobachtet werden. Gut induzierbare Expressionssysteme auf der Grundlage von Glucocortikoid-Bindungs-Domänen in transgenen Pflanzen wurden schon mehrfach beschrieben. So konnten Schena *et al.* (1991) in dem von ihnen verwendeten transienten CAT-Assay in *Arabidopsis* nach Zugabe des Liganden eine Induktion um das 150-fache beobachten. Lloyd *et al.* (1994) beschrieben eine sehr niedrige Hintergrundexpression und starke Induktion in einigen ihrer stabil transformierten *Arabidopsis*-Linien. Betrachtet man die verschiedenen, bisher in Pflanzen auf Grundlage von Steroidhormonrezeptoren

entwickelten induzierbaren Expressionssysteme, wurden überwiegend GBDs zur Regulation von Genen verwendet (Sчена *et al.*, 1991; Lloyd *et al.*, 1994; Aoyama *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1996, Aoyama & Chua, 1997; McNellis *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1999; Ouwerkerk *et al.*, 2001). Ein Grund hierfür könnte sein, dass Glucocortikoide in Pflanzen keine pleiotropen Effekte verursachen. Darüber hinaus sind Glucocortikoide in den Konzentrationen, die für eine Induktion benötigt werden, nicht toxisch und verursachen in den Pflanzen keine negativen physiologischen Effekte (Aoyama & Chua, 1997). Vergleicht man die aus den oben aufgeführten Arbeitsgruppen erzielten Daten und die Ergebnisse aus den hier transient getesteten Induktionsversuchen, ist offenbar für die Regulation von Genen auf Transkriptionsebene und für die Regulation über die Aktivität des Enzyms die Glucocortikoid-Bindungs-Domäne geeigneter als die LBD des Östrogenrezeptors. Des Weiteren deuten die transient erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass zumindest unter Kontrolle der GBD die direkte Regulation der FLP-Aktivität über Zugabe des Liganden induziert werden und somit das recLBD-System auch in Pflanzen eingesetzt werden kann.

Anschließend wurde die Hintergrundaktivität und Induzierbarkeit der drei verschiedenen LBDs in stabil transformierten Kartoffelpflanzen untersucht und mit den in den transienten Inokulationsversuchen erhaltenen Ergebnissen verglichen. Zur Analyse der stabil transformierten Blätter wurde das Expressionsmuster der β -Glucuronidase nach Induktion der Rekombination histochemisch in Blättern untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Expressionsmuster der β -Glucuronidase nicht nur, wie in den transienten Tests beobachtet, zwischen den einzelnen Liganden-Bindungs-Domänen unterscheidet, sondern auch innerhalb der einzelnen Linien eines Konstruktes unterschiedliche GUS-Expressionsmuster auftreten (Abb. 3.19, 3.20 und 3.21). Von den zehn getesteten Linien des Konstruktes pMPB7-98 (Wildtyp-EBD) konnte in der Linie 98-1 eine Induktion nach Zugabe des Liganden festgestellt werden. Die Linien 98-2, -3, -4, -7 und -9 zeigten weder eine Hintergrundaktivität noch eine GUS-Expression nach Induktion durch das Hormon. In den Linien 98-5, -6, -8 und -10 war nur ein schwacher Hintergrund, aber auch keine Erhöhung der GUS-Expression nach Zugabe des Liganden zu sehen. Auch für die zehn Linien des Konstruktes pMPB7-99 (EBD₂₇₇) konnte keine Induktion nach Zugabe des Liganden

beobachtet werden. In fünf dieser Linien zeigte sich ein schwacher Hintergrund in Form von einzelnen blauen Spots. In den zehn getesteten Linien des Konstruktes pMPB7-100 (GBD) war weder eine Hintergrundaktivität noch eine Induktion nach Zugabe von Dexamethason festzustellen. Da in den Linien 1 bis 6 der Konstrukte pMPB7-98, -99 und -100 über PCR das MAS-Promotor spezifische Fragment nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 3.18), konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Linien um nicht-transgene Pflanzen handelt und deshalb keine GUS-Expression detektiert werden konnte.

Vergleicht man die Hintergrundaktivitäten der stabil transformierten Linien mit den Ergebnissen der beobachteten Hintergrundaktivitäten der transienten Untersuchungen können einige Parallelen festgestellt werden. So wurde für die einzelnen Linien, in denen eine Hintergrundaktivität der β -Glucuronidase vorhanden war, die stärkste Hintergrundaktivität für die FLP-Rekombinase, die mit der EBD₂₅₁ fusioniert war (pMPB7-98), beobachtet, eine sehr schwache Hintergrundaktivität für die FLP-EBD₂₇₇ (pMPB7-99) und gar keine für das GBD-Fusionsprotein (pMPB7-100). Diese Tendenzen zeigten sich auch in den transienten Untersuchungen (vgl. Tab. 3.1).

Vergleicht man die Induzierbarkeit der LBDs in den transienten Versuchen mit denen der stabilen Transformanden, verhält es sich ähnlich. In den Analysen der stabil getesteten LBDs wurde in neun der zehn Linien des Konstruktes pMPB7-98 keine Induktion beobachtet. In den transienten Infiltrationsversuchen der EBD₂₅₁ und EBD₂₇₇ wurde ebenfalls keine Induktion, sondern eine Abnahmen der GUS-Expression nach Zugabe des Liganden beobachtet. Auch die Pflanzen, die mit den GBD-Konstrukten stabil transformiert wurden, zeigten keinen Anstieg der GUS-Expression nach Zugabe des Liganden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, auch wenn in den transienten Induktionsversuchen für die FLP-Rekombinase, die mit der Glucocortikoid-Bindungs-Domäne fusioniert war, eine sehr starke Induktion zu beobachten war. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten bereits gezeigt, dass der Anteil an Zellen, in denen die Rekombinase in einer transgenen Pflanze aktiv ist, äußerst gering ist (Lyznik *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1999).

In Arbeiten, die sich mit transkriptionell induzierbaren Expressionssystemen auf Grundlage von Steroidrezeptoren befassen, kann meist nur in einem geringen Prozentsatz transgener Linien eine starke Induktion festgestellt werden. Lloyd *et al.* (1994) erhielten z.B. nach stabiler Transformation von *Arabidopsis* und RNA-Blot-

Analyse des exprimierten Transgens lediglich acht Linien, die überhaupt induzierbar waren. Von diesen acht zeigte wiederum nur eine Linie eine starke Induzierbarkeit. Kang *et al.* (1999) erhielten nach *Arabidopsis*-Transformation und Analyse der RNA-Expression über RT-PCR 18 transgene Linien, von denen vier Linien induzierbar waren. In den hier durchgeführten Induktionsversuchen mit stabil transformierten Kartoffelpflanzen wurden zehn Linien pro Konstrukt induziert. Dass unter den 30 Linien nur in einer einzigen Linie (pMPB7-98/1) ein Anstieg der GUS-Expression nach Zugabe des Liganden beobachtet werden konnte, liegt also im Rahmen der publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen.

Neben einem niedrigen Anteil an induzierbaren Linien können für die in dieser Arbeit beobachtete fehlende Induktion Positionseffekte oder Mehrfach-Insertionen der T-DNA verantwortlich sein. Logie & Stewart (1995) konnten zeigen, dass die Rekombinationseffizienz abhängig vom Integrationsort ist. In Säugetierzellen war die Expression von FLP-EBD-Fusionsproteinen in Abhängigkeit vom jeweiligen Integrationsort im Genom unterschiedlich stark (Logie *et al.*, 1998). Da unterschiedlich starke Expression von Proteinen bedingt durch den Integrationsort für eine Reihe anderer Fremdproteine in Pflanzen bekannt ist (Dai *et al.*, 2000^{[a][b]}; Scheller *et al.*, 2001), wäre es denkbar, dass die nicht nachweisbare Induzierbarkeit der transgenen Linien in dieser Arbeit mit schwacher oder fehlender Expression des Rekombinase-Fusionsproteins begründet werden kann. Aoyama *et al.* (1995) beobachteten mit ihrem Glucocortikoid-induzierbarem Expressionssystem in *Arabidopsis* unterschiedlich starke Expressionshöhen zwischen den einzelnen Linien. Ouwerkerk *et al.* (2001) beschrieben unterschiedliche Phänotypen, die mit der Anzahl der Insertionen des Transgens und als Folge der unterschiedlichen Integrationsorte in ihrem Glucocortikoid-induzierbarem Expressionssystem in Reis begründet wurden. Eine Auswirkung auf die Induzierbarkeit eines Gens durch Mehrfach-Insertionen der T-DNA oder deren Integrationsort im Genom wurde auch in Pflanzen schon für den Negativ-Selektionsmarker Cytosin-Desaminase beschrieben. Perera *et al.* (1993) zeigten, dass Mehrfach-Insertionen des *codA*-Gens in *Arabidopsis* zu einem Verlust der Sensitivität gegen den Wirkstoff 5-Fluorocytosin (5-FC) führte. Offenbar wurden durch die multiplen Insertionen „gene silencing“-Effekte ausgelöst, wodurch keine Translation der *codA*-mRNA stattfinden konnte. Galego *et al.* (1999) stellten in *Arabidopsis* fest, dass eine Nicht-Expression des Negativ-Markers aufgrund von chromosomalen Positionseffekten oder „gene

silencing“, verursacht durch eine hohe Anzahl von T-DNA-Kopien im Genom, immer zu berücksichtigen seien. Da in der vorliegenden Arbeit nicht näher charakterisierte Linien induziert wurden, darf die fehlende Induktion aufgrund von Mehrfach-Insertionen nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Aspekt der berücksichtigt werden muss, ist der praktische Induktionsvorgang. Um Gen-Expression oder die Aktivität eines Enzyms erfolgreich zu induzieren, spielt der Zeitpunkt, die Applikationsdauer und die Konzentration des Liganden bei der Induktion eine wichtige Rolle. In den bisher untersuchten Steroid-induzierbaren Systemen wurden *Arabidopsis*-Samen entweder eine Woche in Flüssigmedium angezogen und anschließend für zwei Tage 30 μM Ligand hinzugefügt (McNellis *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1999) oder aber Samen drei Tage lang direkt auf 1 μM Induktionsmedium zur Keimung gebracht (Lloyd *et al.*, 1994). Für Tabakpflanzen wurden die Samen entweder 14 Tage auf 10 μM Induktionsmedium angezogen (Aoyama *et al.*, 1995) oder junge Pflänzchen für zwei Tage auf 10 μM Induktionsmedium gesetzt (Aoyama & Chua, 1997). Auch bei monokotylen Pflanzen wie Reis wurden junge Pflanzen sechs Tage lang mit 1 μM Ligand induziert und anschließend analysiert (Ouwerkerk *et al.*, 2001). Von transgenem Mais wurde Kallusgewebe zwei Tage auf Liganden getränktem Filterpapier (10 μM) induziert (Garnaat & Roth, 1997). In allen Expressionssystemen wird die Induktion in einem frühen Entwicklungsstadium der jeweiligen Pflanzen durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden in dem in dieser Arbeit vorgestellten System vier Wochen alte Kartoffelpflanzen mit 10 μM Ligand für fünfeinhalb Tage induziert. Es ist daher anzunehmen, dass der in dieser Arbeit gewählte Induktionszeitpunkt zu spät war. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen hätten folglich Versuche zur Optimierung der Applikation und Verteilung des Induktors ins Gewebe durchgeführt werden müssen.

4.3 Untersuchung der *FRT*site-Mutanten

Neben einer effizienten Eliminierung von Markergenen aus transgenen Pflanzen sollte das zu etablierende System auch für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Ansatz verfolgt, durch Kombination verschiedene *FRT*site-Mutanten ein System zu erhalten, das für Mehrfachtransformationen in Pflanzen eingesetzt werden kann. Für die

Funktionalität eines solchen Systems ist zum einen Voraussetzung, dass die im Genom verbleibende *FRT*site nicht mit den *FRT*sites aus der zweiten Transformationsrunde rekombinieren darf, da nur so Chromosomen-Veränderungen, wie z.B. die Deletion großer DNA-Bereiche, zuverlässig vermieden werden können. Zum anderen müssen die Effizienzen dieser *FRT*sites mindestens denen der Wildtyp *FRT*site entsprechen, um möglichst hohe Rekombinationsraten zu erzielen.

Die ersten Studien mit mutierten *FRT*sites wurden in *E. coli* durchgeführt und dienten dazu, Informationen über die Interaktion der FLP mit ihrer Erkennungssequenz zu bekommen, Bindungsstudien durchzuführen und Hinweise auf den Vorgang der eigentlichen Rekombination zu erhalten (Andrews *et al.*, 1985; Senecoff *et al.*, 1985). In späteren Arbeiten wurden *FRT*site-Mutanten gesucht, mit denen effizientere Rekombinationsraten erreicht werden konnten (Gates & Cox, 1988; Umlauf & Cox, 1988). Schlake & Bode (1994) nutzten die Erkenntnisse der Mutationsstudien, um durch die Kombination von Wildtyp- und mutierten *FRT*sites in Säugetierzellen ein System zur homologen Rekombination zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden acht *FRT*site-Mutanten und die Wildtyp-*FRT*site (vgl. Abb. 3.23) durch homologe und heterologe Kombination transient in Tabak-Protoplasten analysiert. Durch homologe Kombination sollten *FRT*sites identifiziert werden, die ähnliche Rekombinationsraten wie die Wildtyp-*FRT* aufweisen. Durch heterologe Kombination sollten *FRT*sites identifiziert werden, zwischen denen keine Rekombination stattfindet. Als Vorlage der hier getesteten *FRT*site-Mutanten dienten die Mutanten von Umlauf & Cox (1988; hier bezeichnet als Mutante 2) und Schlake & Bode (1994; hier bezeichnet als Mutante 1 und 3). Als Basis für die Mutanten wurde die minimale Wildtyp-*FRT* mit einer Länge von 34 bp eingesetzt. In der Regel besteht sie aus drei 13 bp-Wiederholungen (vgl. Abb. 1.1[c]). *In vitro*-Untersuchungen in Hefe zeigten jedoch, dass die dritte Wiederholung für eine erfolgreiche Rekombination nicht notwendig ist (Andrews *et al.*, 1985). Die Arbeit von Lyznik *et al.* (1993) ergab darüber hinaus, dass in Mais- und Reis-Protoplasten die verkürzte *FRT*site im Vergleich zur Wildtyp-*FRT*site zu einer effizienteren Rekombination führte. In vielen Untersuchungen, die sich mit Mutationsstudien innerhalb der *FRT*site befassten, wurden ebenfalls minimale *FRT*sites eingesetzt (Senecoff & Cox, 1986; Gates & Cox, 1988; Huang *et al.*, 1991; Luetke & Sadowski,

1998; Storici *et al.*, 1999; Nakano *et al.*, 2001), so dass in dieser Arbeit ebenfalls minimale *FRT*sites verwendet wurden.

Durch verschiedene Mutationsstudien in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass mehrere bp-Veränderungen innerhalb der Spacer-Region toleriert werden (Senecoff & Cox, 1986; Senecoff *et al.*, 1988; zur Übersicht: Cox, 1988). Umlauf & Cox (1988) zeigten in *E. coli*, dass zwischen heterologen *FRT*sites keine oder nur sehr geringe Rekombination stattfindet, bei homologer Verwendung der mutierten *FRT*sites aber ähnliche Effizienzen wie bei den Wildtyp-*FRT*sites erreicht werden konnten. In Abb. 3.24 sind die Rekombinationseffizienzen der homolog getesteten *FRT*site-Kombinationen dargestellt. Wie aus dem Balkendiagramm zu erkennen ist, weisen die *FRT*site-Mutanten 1-1, 2-2 und 3-3 auch im pflanzlichen Organismus eine Rekombinationsrate, die dem Wildtyp (WT) entspricht, auf. Bei der Kombination der jeweiligen Mutanten mit einer Wildtyp-*FRT* wurden keine Rekombinationsereignisse beobachtet (Abb. 3.24; 1-WT, 2-WT, 3-WT). Als nächstes wurden verschiedene *FRT*site-Mutanten miteinander kombiniert. Bei den getesteten *FRT*sites 1-3 und 2-3 (Abb. 3.25) konnte zwar eine starke Abnahme der Rekombinationshäufigkeit festgestellt werden, jedoch waren vereinzelt GFP-exprimierende Protoplasten zu sehen. Bei gleichzeitigem Einsatz der *FRT*site-Mutanten 2 und 1 (Abb. 3.26, 2-1 und Abb. 3.27, 1-2) wurden in keiner der drei unabhängigen Transformationen GFP-exprimierende Protoplasten beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von Umlauf & Cox in *E. coli* beobachteten Eigenschaften der *FRT*site-Mutanten auch in Pflanzen gefunden werden konnten.

Bei den *FRT*site-Mutanten 4 und 5 wurde an Position 10 bzw. -10 ein Austausch der Base C→a und G→t durchgeführt. Durch diese Punktmutationen sollten die *FRT*sites nach erfolgter Rekombination von der FLP-Rekombinase nicht mehr als Substrat erkannt werden und könnten somit in weiteren Transformationsrunden nicht zu störenden Nebenreaktionen führen. Senecoff *et al.* (1988) zeigten, dass wenn diese Mutationen nur in einer der *FRT*sites vorhanden war, kaum ein Effekt beobachtet werden konnte. Kamen die Mutationen in beiden FLP-Bindungsstellen gleichzeitig vor, wurde eine starke Abnahme der Rekombinationshäufigkeit festgestellt. Durch die Kombination der Mutante 4 mit der Wildtyp-*FRT* (Abb. 3.23, 4-WT) und der Mutante 5 mit der Wildtyp-*FRT* (Abb. 3.26, 5-WT) konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation auch im Tabak keinen signifikanten Einfluss auf die Rekombinations-

effizienzen der FLP-Rekombinase ausübt, wenn sie nur in einer der beiden *FRT*sites eingebracht wurde. In beiden Fällen wurden eine ähnliche Rekombinationshäufigkeit wie bei der Wildtyp-*FRT* beobachtet. Dieses konnte auch durch andere *FRT*site-Kombinationen bestätigt werden, bei denen sich das Rekombinationsverhalten durch die eingefügte Punktmutation nicht vom WT unterschied (Abb. 3.24: 4-WT; Abb. 3.27: 4-3; Abb. 3.28: 4-2, 1-5 und 2-5). Die Punktmutationen an Position 10 bzw. -10 übten keinen signifikanten Einfluss auf die Rekombinationseffizienzen aus. Bei den Mutanten 6, 7 und 8 handelte es sich um zufällig entstandene Mutationen (vgl. Abb. 3.22). Keine dieser Punktmutationen zeigten starke Effekte auf die Rekombinationshäufigkeit der FLP-Rekombinase.

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen der *FRT*site-Mutanten, dass mehrfache Basen-Austausche innerhalb der Spacer-Region auch im pflanzlichen System toleriert werden, wobei eine vollständige Homologie der beiden miteinander reagierenden *FRT*sites notwendig ist. Rekombination zwischen der Wildtyp-*FRT* und *FRT*-Mutante wurden nicht beobachtet. Ob eine Rekombination zwischen zwei unterschiedlich mutierten *FRT*sites stattfindet, hängt von der jeweiligen Kombination der Spacer-Mutanten ab. Punktmutationen außerhalb der Spacer-Region zeigen keine starken Effekte auf die Rekombinationseffizienz. Mit den hier getesteten *FRT*site-Mutanten wurden zwei Mutanten identifiziert, die zum einen keine Rekombination miteinander und mit der WT-*FRT*site betreiben, zum anderen ähnlich gute Rekombinationseffizienzen wie der WT aufweisen und somit für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden können.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte in transienten Versuchen erstmals gezeigt werden, dass auch im pflanzlichen Organismus eine direkte Regulation der Aktivität eines Enzyms über die Fusion mit der Liganden-Bindungs-Domäne von Steroidrezeptoren möglich ist. Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch auch, dass eine Reihe von weiteren Versuchen durchgeführt werden müssen, um eine erfolgreiche Induktion in stabil transformierten Pflanzen zu erzielen.

Wie schon diskutiert, können Mehrfach-Insertionen der T-DNA oder deren Integrationsort im Genom einen beträchtlichen Einfluss auf die Induzierbarkeit eines

Gens ausüben (Ouwerkerk *et al.*, 2001; Galego *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde für die meisten Steroid-induzierbaren Expressionssysteme eine sehr niedrige Ausbeute an gut induzierbaren Linien nach Transformation beobachtet (Lloyd *et al.*, 1994; Kang *et al.*; 1999). Um Linien mit Einzelkopien zu regenerieren, die eine hohe Expression aufweisen, sollten mindestens fünfzig Linien pro Konstrukt hergestellt und genetisch analysiert werden. Vor allem in Bezug auf die später stattfindende Negativ-Selektion wäre es sinnvoll, weitere Untersuchungen mit Linien durchzuführen, bei denen nur eine Kopie der T-DNA vorhanden ist. Dieses sollte beachtet werden, da gerade für die Cytosin-Desaminase ein Verlust der Aktivität aufgrund von Mehrfach-Insertionen des *codA*-Gens immer wieder beschrieben wurde (Perera *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1995; Galego *et al.*, 1999). Um optimale Induktionsbedingungen für Kartoffel zu erhalten, müssen weiterhin der Zeitpunkt und eventuell auch die Art der Applikation des Liganden optimiert werden. Hierzu sollte auf jeden Fall untersucht werden, ob eine Induktion des Kallusgewebes, wie schon bei Mais erfolgreich durchgeführt (Garnaat & Roth, 1997), auch für Kartoffel geeignet ist. Zum anderen müssen verschiedene Liganden-Konzentration getestet werden, wobei sich Konzentrationen von 10 μM bis 100 μM für eine Induktion anbieten. Sind die optimalen Parameter zur Induktion der FLP-Rekombinase bekannt, muss als nächstes die Induktion des Negativ-Selektionsmarkers untersucht werden. Hierbei wird vor allem die Wahl des Zeitpunktes zwischen der Induktion der Rekombination und der Induktion der Negativ-Selektion zu beachten sein. Wird der Zeitpunkt der Negativ-Selektion zu früh gewählt, besteht die Möglichkeit, dass zuwenig Markergen-freie Zellen vorhanden sind und der durch den Marker hervorgerufene Zelltod soviel Gewebe zerstört, dass keine Regeneration von Markergen-freien Zellen mehr möglich ist. Wird die Negativ-Selektion zu spät induziert, können chimäre Pflanzen entstehen. Um Chimären zu verhindern, wäre ein weiterer Ansatzpunkt eine Regeneration über Embryogenese zu testen, da diese aus Einzelzellen bestehen.

Da die Induktionsversuche an den stabil transformierten Kartoffeln nur einmal durchgeführt wurden und viele Aspekte, wie z. B. die Anzahl der T-DNA-Insertionen, der Zeitpunkt der Induktion oder die Konzentration des Liganden, nicht mehr analysiert werden konnten, wird davon ausgegangen, dass sich die in den transienten Inokulationsversuchen erzielten Ergebnisse für die Glucocortikoid-Bindungs-Domäne

auch in der stabil transformierten Kartoffel reproduzieren lassen, wenn die unterschiedlichen Parameter sorgfältig optimiert werden.

Die transienten Protoplasten-Assays in Tabak haben gezeigt, dass mit den hier getesteten *FRT*site-Mutanten ein System entwickelt wurde, das für Mehrfachtransformationen eingesetzt werden kann. Die Funktionalität dieses Systems muss als nächstes in stabil transformierten Kartoffeln überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlage für die nachhaltige Etablierung eines in der Praxis anwendbaren Systems zur Entfernung von Markergenen zu legen, das auch im Hinblick auf eine kommerzielle Anwendung geeignet ist.

Das hier getestete Expressionssystem basiert auf der direkten Regulation der Aktivität der FLP-Rekombinase durch die Fusion mit der Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) von Steroidrezeptoren in Kombination mit einem Positiv-/Negativ-Selektionssystem. Alle zur Regulation und Selektion benötigten Bausteine wurden zwischen die beiden *FRT*sites kloniert. Diese Komponenten können nach Selektion der transgenen Pflanzen gezielt entfernt werden, so dass nur noch der Promotor und das Fremdgen im pflanzlichen Genom enthalten sind.

In transienten Inokulationsversuchen in Tabak wurde die Regulation der FLP-Rekombinase auf Proteinebene über die Fusion des Proteins mit der LBD dreier verschiedener Steroidrezeptoren untersucht. Es wurden Unterschiede in der Effizienz und der Funktionalität der verschiedenen LBDs beobachtet. Die zwei verschiedenen LBDs des Östrogenrezeptors (EBD₂₅₁ und EBD₂₇₇) wiesen eine starke Hintergrundaktivität auf und zeigten keine Induktion nach Zugabe verschiedener Ligandenkonzentrationen. Die FLP-Rekombinase unter Regulation der LBD des Glucocortikoidrezeptors (GBD) zeigte kaum Basisaktivität und reagierte auf die unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen mit einem hohen Induktionspotential. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter Kontrolle der GBD die direkte Regulation der FLP-Aktivität über Zugabe des Liganden induziert wird und somit das recLBD-System auch in Pflanzen eingesetzt werden kann.

Die Funktionalität dieses Systems wurde in ersten Induktionsversuchen in stabil transformierten Kartoffeln analysiert. Wie in den transienten Versuchen wurde auch hier eine Hintergrundaktivität für die verschiedenen LBDs des Östrogenrezeptors (EBD₂₅₁ und EBD₂₇₇) beobachtet. Eine Induktion nach Zugabe verschiedener Ligandenkonzentrationen konnte nur in einer einzigen Linie der Konstrukte, in denen die FLP-Rekombinase unter Kontrolle der EBD₂₅₁ stand, festgestellt werden. Für die FLP-Rekombinase unter Regulation der GBD wurde in stabil transformierten Kartoffeln weder eine Basisaktivität noch eine Induktion nach Zugabe des Liganden beobachtet.

Bei der Analyse verschiedener *FRT*site-Mutanten wurden zusätzlich zur Wildtyp-*FRT*site zwei Mutanten identifiziert, die keine Rekombination miteinander und mit der Wildtyp-*FRT*site betreiben und ähnlich gute Rekombinationseffizienzen wie der Wildtyp aufweisen. Dadurch ist es möglich, das etablierte System auch für Mehrfachtransformationen (bis zu drei aufeinander folgende) einzusetzen.

6. Anhang

Tab. 6.1: Plasmidnamen und zugehörige Mutanten-Bezeichnung der von S. Unseld klonierten und in dieser Arbeit getesteten *FRT*site-Mutanten. Die Plasmide sind wie pMPB7-4 aufgebaut (vgl. Tab. 2.5) und unterscheiden sich nur in den jeweiligen *FRT*sites.

| Plasmidname | Mutante | FRT1 | FRT2 |
|-------------|---------|--|--|
| pMPB7-4 | WT | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-13 | 1-WT | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-14 | 2-WT | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-15 | 4-WT | GAAGTTCaTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-16 | 3-WT | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-17 | 6-WT | GAAGTTCaTATTC - TgTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-21 | WT-5 | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAiGAACTTC |
| pMPB7-22 | 1-3 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-23 | 1-1 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-24 | 2-3 | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-25 | 6-5 | GAAGTTCaTATTC - TgTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAiGAACTTC |
| pMPB7-26 | WT-8 | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTAgTC - TCTAGAAA - GTATAiGAACTTC |
| pMPB7-27 | 1-7 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGgTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-28 | 2-1 | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-29 | 2-2 | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-30 | 4-3 | GAAGTTCaTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-31 | 4-1 | GAAGTTCaTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-32 | 4-2 | GAAGTTCaTATTC - TCTAGAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-33 | 1-5 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAiGAACTTC |
| pMPB7-34 | 3-3 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAtA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-35 | 1-2 | GAAGTTCCTATTC - TtcAaAAg - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC |
| pMPB7-36 | 2-5 | GAAGTTCCTATTC - TgTAcAAA - GTATAGGAACTTC | GAAGTTCCTATTC - TCTAGAAA - GTATAiGAACTTC |

7. Literaturverzeichnis

- Adlercreutz, H., Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Höckerstedt, K.A.V., Watanabe, S. (1995). Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.* 125, 757-70S.
- Andrews, B.J., Proteau, G.A., Beatty, L.G., Sadowski, P.D. (1985). The FLP recombinase of the 2 μ circle DNA of yeast: Interaction with its target sequences. *Cell* 40, 795-803.
- Angrand, P.O., Woodroffe, C.P., Buchholz, F., Stewart, A.F. (1998). Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic Acids Research* 26, 3263-3269.
- Aoyama, T., Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* 11, 605-612.
- Aoyama, T., Dong, C.H., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G., Chua, N.H. (1995). Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* 7, 1773-85.
- Austin, E., Huber, B. (1993). A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Molecular Pharmacology* 43, 380-387.
- Bar, M., Leshem, B., Gilboa, N., Gidoni, D. (1996). Visual characterization of recombination at FRT-gusA loci in transgenic tobacco mediated by constitutive expression of the native FLP recombinase. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 407-413.
- Bayley, C.C., Morgan, M., Dale, E.C., Ow, D.W. (1992). Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant Molecular Biology* 18, 353-361.
- Béclin, C., Charlot, F., Botton, E., Jouanin, L., Doré, C. (1993). Potential use of the aux2 gene from *Agrobacterium rhizogenes* as a conditional negative marker in transgenic cabbage. *Transgen Res* 2, 38-55.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6), 1513-1523.
- Bradbury, R.B., White, D.E. (1954). Oestrogens and related substances in plants. *Vitam. Horm.* 12, 207-233.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradshaw, H., Deininger, P. (1984). Human Thymidine Kinase Gene: Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of a cDNA Expressible in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* 4, 2316-2320.

- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B., Bowen, B. (2000). Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *The Plant Cell* 12, 65-79.
- Buchholz, F., Ringrose, L., Angrand, P.-O., Rossi, F., Stewart, A.F. (1996). Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Research* 24 (21), 4256-4262.
- Buchholz, F., Angrand, P.-O., Stewart, A.F. (1998). Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nature Biotechnology* 16, 657-662.
- Bullock, W., Fernandez, J., Short, J. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Arch Biochem Biophys* 288, 1-9.
- Cox, M.M. (1988). FLP Site-Specific Recombination System of *Saccharomyces cerevisiae*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Cregg, J.M., Madden, K.R. (1989). Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *Mol Gen Genet* 219, 320-3.
- Czakó, M., Jang, J.C., Herr, J.M. Jr., Márton, L. (1992). Differential manifestation of seed mortality induced by seed-specific expression of the diphtheria toxin chain A gene in *Arabidopsis* and tobacco. *Mol Gen Genet* 235, 33-40.
- Czakó, M., Marathe, R., Xiang, C., Guerra, D., Bishop, G., Jones, G., Márton, L. (1995). Variable expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in *Nicotiana tabacum* affects negative selection. *Theoretical and applied genetics* 91, 1242-1247.
- Czakó, M., Márton, L. (1994). The herpes simplex virus thymidine kinase gene as a conditional negative-selection marker gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 104, 1067-1071.
- Dai, Z.Y., Hooker, B.S., Anderson, D.B., Thomas, S.R. (2000 [a]). Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting. *Molecular Breeding* 6 (3), 277-285.
- Dai, Z.Y., Hooker, B.S., Anderson, D.B., Thomas, S.R. (2000 [b]). Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Research*, 9 (1), 43-54.
- Dai, S., Carcamo, R., Zhang, Z., Chen, S., Beachy, R.N. (2001). The bacterial cytosine deaminase gene used as a conditional negative selection marker in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* 20, 738-743.
- Dale, E.C., Ow, D.W. (1991). Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 88, 10558-10562.

- Davies, G., Kilby, N.J., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H. (1999). Somatic and germinal inheritance of an FLP-mediated deletion in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* 50, 1447-1456.
- Depicker, A., Jacobs, A., Van Montagu, M. (1988). A negative selection scheme for tobacco protoplast-derived cells expressing T-DNA gene 2. *Plant Cell Report* 7, 63-66.
- Düring, K. (1994). A plant transformation vector with a minimal T-DNA. *Transgenic Research* 3, 138-140.
- Endo, S., Kasahara, T., Sugita, K., Ebinuma, H. (2002). A new GST-MAT vector containing both *ipt* and *iaaM/H* genes can produce marker-free transgenic tobacco plants with high frequency. *Plant Cell Report* 20, 923-926.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Farnsworth, N.R., Bingel, A.S., Cordell, G.A., Crane, F.A., Fond, H.H.S. (1974). Potential value of plants as sources of new antifertility agents. *J. Pharmacol. Sci.* 64, 717-754.
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890.
- Freeman, S., Whartenby, K., Freeman, J., Abboud, C., Marrogi, A. (1996). In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Seminars in Oncology* 23, 31-45.
- Gallego, M.E., Sirand-Pugnet, P., White, C.L. (1999). Positive-negative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation. *Plant Molecular Biology* 39, 83-93.
- Garnaat, C.W., Roth, B. (1997). Expression analysis of maize cell lines using high-throughput mRNA purification. *Science Tools from Pharmacia Biotech* 2, 10-11.
- Gates, C.A., Cox, M.M. (1988). FLP recombinase is an enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 4628-4632.
- Gatz, C., Quail, P.H. (1988). Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promotor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85, 1394-1297.
- Gatz, C., Froberg, C., Wendenburg, R. (1992). Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 2, 397-404.
- Gatz, C., Lenk, I. (1998). Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Sciences* 3, 352-358.

- Gidoni, D., Bar, M., Gilboa, N. (2001). FLP/FRT-mediated restoration of normal phenotypes and clonal sectors formation in rolC transgenic tobacco. *Transgenic Research* 10, 317-328.
- Gil, P. Green, P.J. (1996). Multiple regions of the Arabidopsis SAUR-ACI gene control transcript abundance: the 3'untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *EMBO J* 15, 1678-1686.
- Gleave, A.P., Mitra, D.S., Mudge, S.R., Morris, B.A.M. (1999). Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Molecular Biology* 40, 223-235.
- Gronemeyer, H., Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1173-1308.
- Hausmann, L., Töpfer, R. (1999). Entwicklung von Plasmid-Vektoren. Vorträge zur Pflanzenzüchtung: Bioengineering für Rapsorten nach Maß, Heft 45, 155-172.
- Hood, E.E., Melchers, L.S., Hoekema, A. (1993). New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgen Res* 2, 208-218.
- Huang, L.C., Wood, E.A., Cox, M.M. (1991). A bacterial model system for chromosomal targeting. *Nucleic Acids Research* 19, 443-448.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6, 3901-3907.
- Kang, H.G., Fang, Y., Singh, K.B. (1999). A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *The Plant Journal* 20, 127-133.
- Karlin-Neumann, G.A., Brusslan, J.A., Tobin, E.M. (1991). Phytochrome control of the tms2 gene in transgenic Arabidopsis: a strategy for selecting mutants in the signal transduction pathway. *Plant Cell* 3 (6), 573-582.
- Karreman, C. (1998). A new set of positive/negative selectable markers for mammalian cells. *Gene* 218, 57-61.
- Karreman, C. (2000). Use of fusion to thymidine kinase. *Methods in Enzymology* 326, 134-146.
- Kilby, N.J., Davies, G.J., Snaith, M.R., Murray, J.A.H. (1995). FLP recombinase in transgenic plants: constitutive activity in stably transformed tobacco and generation of marked cell clones in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 8, 637-652.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R., Murray, J.A.H. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends in Genetics* 9, 413-421.

- Kobayashi, T., Hisajima, S., Stougaard, J., Ichikawa, H. (1995). A conditional negative selection for *Arabidopsis* expressing a bacterial cytosine deaminase gene. *Jpn.J.Genet.* 70, 409-422.
- Köhler, U., Mendel, R.R., Cerff, R., Hehl, R. (1996). A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco. *The Plant Journal* 10, 175-183.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., Goldberg, R.B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2, 1201-1224.
- Koning, A., Jones, A., Fillatti, J.J., Comai, L., Lassner, M.W. (1992). Arrest of embryo development in *Brassica napus* mediated by modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Plant Molecular Biology* 18 (2), 247-258.
- Koprek, T., McElroy, D., Louwerse, J., Williams-Carrier, R., Lemaux, P. (1999). Negative selection systems for transgenic barley (*Hordeum vulgare*, L.): comparison of bacterial *codA*- and cytochrome P450 gene-mediated selection. *The Plant Journal* 19, 719-726.
- Kurzer, M., Xu, X. (1997). Dietary Phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 17, 353-381.
- Lal, S., Lauer, U.M., Niethammer, D., Beck, J.F., Schlegel, P.G. (2000). Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunology Today* 21, 48-54.
- Lloyd, A.M., Davis, R.W. (1994). Functional expression of the yeast FLP/FRT site-specific recombination system in *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 242, 653-657.
- Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V., Davis, R.W. (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* 266, 436-439.
- Logie, C., Stewart, A.F. (1995). Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5940-4.
- Logie, C., Nichols, M., Myles, K., Funder, J.W., Stewart, A.F. (1998). Positive and negative discrimination of estrogen receptor agonists and antagonists using site-specific DNA recombinase fusion protein. *Mol Endocrinol* 12, 1120-1132.
- Luetke, K.H., Sadowski, P.D. (1998). DNA sequence determinant for FLP-induced DNA bending. *Mol Microbiol* 29, 199-208.
- Lyznik, L.A., Hirayama, L., Rao, K.V., Abad, A., Hodges, T.K. (1995). Heat-inducible expression of FLP gene in maize cells. *The Plant Journal* 8, 177-186.
- Lyznik, L.A., Mitchell, J.C., Hirayama, L., Hodges, T.K. (1993). Activity of yeast FLP recombinase in maize and rice protoplasts. *Nucleic Acids Res* 21, 969-75.
- Macleod, R. (1971). Thymidine kinase and thymidylate synthetase in meristems of *Vicia faba*. *Protoplasma* 73, 337-348.

- Maeser, S., Kahmann, R. (1991). The Gin recombinase of phage Mu can catalyse site-specific recombination in plant protoplasts. *Mol Gen Genet* 230, 170-6.
- Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeleer, M., De Block, M., Goldberg, R.B., De Greef, W., Leemans, J. (1992). A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357, 384-387.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J.M. (1995). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiology* 107, 679-685.
- McNellis, T., Mudgett, M., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H., Staskawicz, B. (1998). Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 14, 247-257.
- Mengiste, T., Amedeo, P., Paszkowski, J. (1997). High-efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* with a selectable marker gene regulated by the T-DNA 1'-Promotor. *The Plant Journal*, 12 (4), 945-948.
- Mullen, C.A., Kilstrup, M., Blaese, R.M. (1992). Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 33-37.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15, 473-497.
- Murkies, A.L., Wilcox, G., Davies, S.R. (1998). Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297-303.
- Nakano, M., Ishimur, M., Chiba, J., Kanegae, Y., Saito, I. (2001). DNA substrates influence the recombination efficiency mediated by FLP recombinase expressed in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 45, 657-665.
- Nichols, M., Rientjes, J.M., Logie, C., Stewart, A.F. (1997). FLP Recombinase/Estrogen Receptor Fusion Proteins Require the Receptor D Domain for Responsiveness to Antagonists, but not Agonists. *Molecular Endocrinology* 77, 950-961.
- Odell, J., Caimi, P., Sauer, B., Russell, S. (1990). Site-directed recombination in the genome of transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* 223, 369-378.
- Odell, J., Russell, S. (1994). Use of site-specific recombination systems in plants. In: Paszkowski J. (ed.) *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*. (pp.219-270). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- O'Keefe, D.P., Tepperman, J.M., Dean, C., Leto, K.J., Erbes, D.L., Odell, J.T. (1994). Plant expression of a bacterial cytochrome P450 that catalyzes activation of a sulfonylurea pro-herbicide. *Plant Physiology* 105 (2), 473-482.

- Onouchi, H., Nishihama, R., Kudo, M., Machida, Y., Machida, C. (1995). Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 247, 653-60.
- Ouwerkerk, P.B.F., de Kam, R.J., Hoge, J.H.C., Meijer, A.H. (2001). Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta* 213, 370-378.
- Ow, D. (2001). The right chemistry for marker gene removal? *Nature Biotechnology* 19, 115-116.
- Ow, D., Medberry, S. (1995). Genome manipulation through site-specific recombination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 239-261.
- Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M., Matzke, M.A. (1996). Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *The Plant Journal* 9, 183-194.
- Perera, R., Linard, C., Singer, E. (1993). Cytosine deaminase as a negative selective marker for *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 23, 793-799.
- Picard, D. (1994). Regulation of protein function through expression of chimaeric proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 511-515.
- Reiss, B., Sprengel, R., Schaller, H. (1984). Protein fusions with the kanamycin resistance gene from transposon Tn5. *EMBO* 3, 3317-3322.
- Renckens, S., Greve, H., Van Montagu, M., Hernalsteens, J. (1992). Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. *Mol Gen Genet* 233, 53-64.
- Risseuw, E., Franke-van Dijk, M., Hooykaas, P. (1997). Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *The Plant Journal* 11, 717-728.
- Röder, F.T., Schmülling, T., Gatz, C. (1994). Efficiency of the tetracycline-dependent gene expression system: complete suppression and efficient induction of the *rolB* phenotype in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 243, 32-38.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, B. (1994). Site-specific recombination: developments and applications. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 521-527.
- Scheller, J., Guhrs, K.H., Grosse, F., Conrad, U. (2001). Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nature Biotechnology* 19 (6), 573-577.
- Schena, M., Lloyd, A.M., Davis, R.W. (1991). A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 88, 10421-10425.

- Schlake, T., Bode, J. (1994). Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci. *Biochemistry* 33, 12746-51.
- Schlaman, H., Hooykaas, P. (1997). Effectiveness of the bacterial gene *codA* encoding cytosine deaminase as a negative selectable marker in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *The Plant Journal* 11, 1377-1385.
- Schwenk, F., Kühn, R., Angrand, P.-O., Rajewsky, K., Stewart, A.F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Research* 26, 1427-1432.
- Senecoff, J.F., Bruckner, R.C., Cox, M.M. (1985). The FLP recombinase of the yeast 2- μ m plasmid: Characterization of its recombination site. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 82, 7270-7274.
- Senecoff, J.F., Cox, M.M. (1986). Directionality in FLP protein-promoted site-specific recombination is mediated by DNA-DNA pairing. *The Journal of Biological Chemistry* 261, 7380-7386.
- Senecoff, J.F., Rossmeissl, P.J., Cox, M.M. (1988). DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 μ m plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site. *Journal of Molecular Biology* 201, 405-421.
- Serino, G., Maliga, P. (1997). A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *Plant Journal* 12, 697-701.
- Simon, R., Igono, M.I., Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384, 59-62.
- Shutt, D.A., Cox, R.I. (1972). Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *Endocrinology* 52, 299-310.
- Sonti, R.V., Tissier, A.F., Wong, D., Viret, J.-F., Signer, E.R. (1995). Activity of the yeast FLP recombinase in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 28, 1127-1132.
- Srivastava, V., Ow, D. (2001). Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase-expressing construct. *Plant Molecular Biology* 46, 561-566.
- Storici, F., Coglievina, M., Bruschi, C.V. (1999). A 2-microm DNA-based marker recycling system for multiple gene disruption in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]. *Yeast* 15, 271-83.
- Stougaard, J. (1993). Substrate-dependent negative selection in plants using a bacterial cytosine deaminase gene. *The Plant Journal* 3, 755-761.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., Botterman, J. (1995). Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *BioTechnology*, 13, 1085-1089.

- Stuurman, J., Nijkamp, H.J., van Haaren, M.J.J. (1998). Molecular insertion-site selectivity of Ds in tomato. *The Plant Journal* 14, 215-223.
- Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E., Ebinuma, H. (2000). A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency. *The Plant Journal* 22, 461-469.
- Thyckjær, T., Finnemann, J., Schauser, L., Christensen, L., Poulsen, C., Stougaard, J. (1997). Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant Molecular Biology* 35, 523-530.
- Umlauf, S.W., Cox, M.M. (1988). The functional significance of DNA sequence structure in a site-specific genetic recombination reaction. *The EMBO Journal* 7, 1845-1852.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L., Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220, 245-250.
- Velten, J., Velten, L., Schell, J. (1984). Isolation of a dual plant promoter fragment from Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal*, 3 (12), 2723-2730.
- Webster, N.J.G., Green, S., Jin, J.R., Chambon, P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54, 199-207.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H., Gatz, C. (1994). A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant Journal* 5, 559-569.
- Xiang, C., Guerra, D. (1993). The Anti-*nrpII* Gene: A potential negative selectable marker for plants. *Plant Physiology* 102, 287-293.
- Yoder, J.I., Goldsbrough, A.P. (1994). Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. *Bio/technology* 12, 263-267.
- Zuo, J., Chua, N.H. (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 146-151.
- Zuo, J., Niu, Q.-W., Chua, N.-H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* 24, 265-273.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Geir Møller, S., Chua, N.H. (2001). Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 19, 157-161.

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum/-ort: 16. Oktober 1971 in Recklinghausen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULE

08.1978 – 06.1982 Grundschole an der Schulstraße, Recklinghausen
08.1982 – 05.1991 Marie-Curie-Gymnasium, Recklinghausen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

AUSBILDUNG

09.1991 – 06.1993 Ausbildung zur „Biologisch-technischen Assistentin“ an der
Berufsbildenden Schule 16 der Stadt Köln
Abschluss: Staatlich geprüfte „Biologisch-technische Assistentin“

STUDIUM DER BIOLOGIE

10.1993 – 09.1994 Grundstudium an der TH Darmstadt
10.1994 – 09.1999 Grund- und Hauptstudium an der Ruhr-Universität Bochum
Studienschwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Molekularbiologie,
Mikrobiologie, Humangenetik
Diplomarbeit am LS für Pflanzenphysiologie bei Prof. Dr. E.W. Weiler
Thema: „Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der
Nitrilasen 1 und 2 aus *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.“
Abschluss: Diplom-Biologin

PROMOTION

seit 01.2000 Promotion an der TU Braunschweig unter Anleitung von Herrn PD Dr. Klaus
Düring. Durchführung der praktischen Arbeiten in der Firma MPB Cologne
GmbH, Köln zum Thema: „DNA-Rekombination in Pflanzen durch funktionelle
Rekombinaseaktivierung“.

VERÖFFENTLICHUNG

2001 Vorwerk, S., Biernacki, S., Hillebrand, H., Janzik, I., Müller, A., Weiler, E.W.,
Piotrowski, M. (2001) Enzymatic characterization of the recombinant
Arabidopsis thaliana nitrilase subfamily encoded by the *NIT2/NIT1/NIT3*-
gene cluster. *Planta*, 212: 508-516.

DANKSAGUNG

Dr. Klaus Düring möchte ich für die Überlassung des Themas und das entgegengebrachte Vertrauen danken. Vor allem in den letzten zwei Monaten meiner Arbeit hat er mich immer wieder durch unerwartete Anrufe und E-Mails motivieren können.

Dr. Reinhard Hehl danke ich für die Übernahme des Koreferats. Darüber hinaus ermöglichte er mir in seiner Arbeitsgruppe in Braunschweig einige meiner Versuche beenden zu können.

Dr. Lorenz Bülow hat sich in Braunschweig pfleglich um meine Pflänzchen gekümmert und war immer als Ansprechpartner für mich da, danke!

Dr. Renate Lühns danke ich für die wissenschaftliche Betreuung während meiner Doktorarbeit bei MPB Cologne. Auch während des Zusammenschreibens durfte ich von ihrem Erfahrungsschatz profitieren.

Dem Labor 39/6 danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die technische Unterstützung. Vor allem zum Ende hin konnte ich oft auf den Beistand von Jaqueline Bautor und Sabina Pabst zählen.

Es gibt einige Menschen, denen ich im Zuge dieser Arbeit besonders danken möchte:

Dr. Irina Wenderoth stand mir während meiner Zeit bei MBP Cologne nicht nur freundschaftlich, sondern auch wissenschaftlich immer zur Seite! Irina, Du weißt gar nicht, wie oft Du mich vor einem Nervenzusammenbruch während des Zusammenschreibens gerettet hast!

Dr. Urte Wendt, ebenso wie Irina hat sie mich immer wieder zur rechten Zeit auf den Boden der Tatsachen gebracht. Grillwürstchen und das beste Roastbeef, das ich jemals gegessen habe, taten ihren Rest dazu. Außerdem hat sie mich wieder dem Fußball näher gebracht.

Dr. Helke Hillebrandt begleitet mich seit meiner Diplomarbeit nicht nur freundschaftlich, sondern lässt mich immer noch von ihrem wissenschaftlichen Erfahrungsschatz profitieren. Oftmals hat sie mich durch gezielte Fragen oder Anmerkungen auf den richtigen Weg gebracht, danke!

Last but not least! Mein größter Dank gilt meinem Freund Andreas Kunert. Wie heißt es so schön: hinter jeder erfolgreichen Frau steht ein starker Mann! Er hat, vor allem in diesem letzten Jahr, alle meine Launen ertragen und mich in jeder nur möglichen Art und Weise unterstützt. Wer mich näher kennt, weiß was das bedeutet!